



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Dottorato di Ricerca in Scienze Agrarie e Veterinarie

Programma: Produzioni Animali, Sanità ed Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima
Mediterraneo

Settore scientifico-disciplinare: Vet05

*Valutazione della sicurezza e del potenziale tecnologico di batteri
lattici isolati da pecorini tradizionali prodotti in Toscana*

Candidata

Dr.ssa Barbara Turchi

Docente Guida

Prof. Domenico Cerri

“It’ s a long way to the top
if you wanna rock ‘n’ roll”
AC/DC

Indice

1. Introduzione	7
2. I batteri lattici	8
2.1 Genere <i>Lactococcus</i>	10
2.2 Genere <i>Streptococcus</i>	11
2.3 Genere <i>Pediococcus</i>	13
2.4 Genere <i>Leuconostoc</i>	14
2.5 Genere <i>Enterococcus</i>	15
2.6 Genere <i>Lactobacillus</i>	16
2.6.1 Lattobacilli omofermentanti obbligati	17
2.6.2 Lattobacilli eterofermentanti facoltativi	18
2.6.3 Lattobacilli eterofermentanti obbligati	19
3. Utilizzo dei batteri lattici nell'industria casearia	20
3.1 Le colture starter	20
3.2 Le colture secondarie	26
3.3 Le colture probiotiche	27
3.4 Le colture protettive	30
4. L'antibiotico-resistenza	31
4.1 Selezione di antibiotico-resistenze	32
4.2. Antibiotico-resistenza nei batteri lattici: gli alimenti come vettori	34
4.3. Aspetti normativi	39
5. Caratterizzazione tecnologica dei batteri lattici.....	44
5.1 Attività acidificante	45
5.2 Attività proteolitica	48
5.3 Resistenza agli stress osmotici e al calore	53
6. Tipizzazione batterica tramite <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	56
6.1 Messa a punto di un nuovo protocollo MLST	58
6.2 <i>Multilocus sequence typing</i> per lo studio di batteri lattici	59

7. Scopo della tesi.....	63
8. Materiali e metodi.....	64
8.1 Ceppi batterici	64
8.2 Valutazione dell'antibiotico-resistenza	66
8.2.1 Diffusione su piastra (metodo di Kirby-Bauer).....	66
8.2.2 Determinazione del valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.) mediante metodo delle microdiluizioni	68
8.3 Ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici	71
8.4 Caratterizzazione tecnologica dei ceppi	72
8.4.1 Valutazione dell'attività acidificante	72
8.4.2 Valutazione dell'attività proteolitica mediante metodica spettrofotometrica.....	73
8.4.3 Resistenza a diverse concentrazioni di cloruro di sodio	75
8.4.4 Resistenza a diverse temperature.....	76
8.4.5 Caratterizzazione delle attività enzimatiche/fermentative mediante API system	76
8.4.5.1 Caratterizzazione di <i>Lactobacillus</i> spp. mediante API50 CH	76
8.4.5.2 Caratterizzazione di <i>Lactococcus</i> spp. mediante API20 Strep.....	78
8.5 Selezione dei ceppi e studio della loro biodiversità mediante metodo genotipico <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	79
9. Risultati e Discussioni	82
9.1 Valutazione dell'antibiotico-resistenza	82
9.1.1 Diffusione su piastra (metodo di Kirby-Bauer).....	82
9.1.2 Determinazione del valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.) mediante metodo delle microdiluizioni	86
9.1.2.1 Distribuzione dei valori di M.I.C. (ppm) per <i>Lactobacillus</i> spp e <i>Lactococcus</i> spp	90
9.1.3 Confronto tra i due metodi utilizzati per la valutazione della resistenza fenotipica verso gli antibiotici.....	106
9.1.4 Ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici	108
9.2 Caratterizzazione tecnologica dei ceppi	110
9.2.1 Valutazione dell'attività acidificante	110
9.2.2 Valutazione dell'attività proteolitica mediante metodica spettrofotometrica.....	116

9.2.3 Resistenza a diverse temperature di sviluppo e a diverse concentrazioni di cloruro di sodio	121
9.2.4 Caratterizzazione delle attività enzimatiche/fermentative mediante API system	125
9.2.4.1 Caratterizzazione del profilo metabolico di <i>Lactobacillus</i> spp mediante API50 CH.....	125
9.2.4.2 Caratterizzazione del profilo metabolico di <i>Lactococcus</i> spp mediante API20 Strep	127
9.3 Selezione dei ceppi e studio della loro biodiversità mediante metodo genotipico <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	129
9.3.1 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST): <i>Lactobacillus paracasei</i>	129
9.3.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST): <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> e <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	133
10. Conclusioni	138
Bibliografia.....	140

Riassunto

Il presente lavoro ha riguardato 54 ceppi di batteri lattici isolati da pecorini tradizionali toscani, prodotti a latte crudo, senza l'impiego di colture starter commerciali. I ceppi in esame erano suddivisi in 28 isolati appartenenti al genere *Lactobacillus* e 26 isolati appartenenti al genere *Lactococcus*. Nello specifico i ceppi appartenevano alle seguenti specie: *Lc. lactis* subsp. *lactis* (n=16), *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (n=8), *Lc. raffinolactis* (n=2), *Lb. paracasei* (n=12) e *Lb. plantarum* (n=16). I ceppi ATCC334, ATCC20174 e ATCC19435 sono stati utilizzati come ceppi di riferimento. Lo scopo della tesi è stato quello di caratterizzare, nella maniera il più completa possibile, tali microrganismi in modo da poterli utilizzare per la realizzazione di prodotti lattiero-caseari tradizionali.

I ceppi selezionati sono stati dapprima sottoposti a valutazione del profilo di antibiotico-resistenza mediante metodiche fenotipiche (diffusione su agar e microdiluizioni). Gli antibiotici presi in considerazione sono stati: ampicillina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, streptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloramfenicolo. I ceppi resistenti sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei geni codificanti antibiotico-resistenza. Gli isolati sono stati successivamente sottoposti a caratterizzazione tecnologica (valutazione dell'attività acidificante, valutazione dell'attività proteolitica, resistenza a cloruro di sodio, resistenza al calore) e valutazione del profilo metabolico mediante sistemi miniaturizzati API. Infine, alcuni ceppi sono stati selezionati per un'indagine relativa alla biodiversità genotipica attraverso la metodica del *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

In accordo con la recente bibliografia, il presente studio ha messo in evidenza che il fenomeno di antibiotico-resistenza risulta essere globalmente contenuto nell'ambito delle flore lattiche. Le maggiori percentuali di resistenza fenotipica sono state riscontrate per il genere *Lactobacillus* nei confronti di cloramfenicolo (66,66%), tetraciclina (46,66%), streptomina (23,07%) e kanamicina (6,6%). Per quanto riguarda *Lactococcus* una bassa percentuale di ceppi resistenti è stata invece riscontrata per tetraciclina (11,11%). È stato possibile osservare un fenotipo resistente accompagnato da un riscontro positivo anche per la presenza di geni codificanti la resistenza nel 5,5% della popolazione studiata e relativamente a tetraciclina (3 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* positivi per il gene *tet(M)*). Per quanto riguarda *Lactobacillus* spp è stata evidenziata una discrepanza tra i risultati ottenuti tramite metodo di Kirby-Bauer e metodo delle microdiluizioni, probabilmente attribuibile alla mancanza di corretti parametri per l'interpretazione dei risultati ottenuti mediante metodo di Kirby-Bauer e alla mancanza di valori di *cut off* uniformati per i due metodi fenotipici utilizzati. Le attività acidificanti e proteolitiche hanno presentato *trend* simili nell'ambito delle specie considerate: *Lb. paracasei* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* hanno mostrato attività maggiori, mentre *Lb. plantarum* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* si sono mostrate globalmente meno acidificanti e meno proteolitiche, seppur con alcune eccezioni. Per quanto riguarda la resistenza a temperatura, tutti i ceppi sono stati in grado di tollerare 40°C e 43°C, solamente 2 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e 1 *Lb. paracasei* tolleravano 45°C. Relativamente alla resistenza al sale tutti i lattobacilli tolleravano 4,5% e 6% NaCl, mentre solo 8 ceppi erano in grado di sviluppare in presenza del 6,5% di NaCl. I lattococchi sono risultati essere invece sensibili già al 4,5% di NaCl, solo 8 ceppi sono stati infatti in grado di crescere, seppur debolmente al 6% NaCl. Sono stati, inoltre, osservati diversi profili API: per quanto riguarda *Lb. plantarum* tra i 16 ceppi studiati sono stati evidenziati 5 profili diversi; per i 12 ceppi *Lb. paracasei* sono stati osservati 7 profili; per i 16 ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* 7 profili; per gli 8 ceppi di *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 5 profili ed infine i due ceppi di *Lc. raffinolactis* presentavano 2 diversi profili biochimici. L'analisi attraverso MLST ha rappresentato un valido strumento per raggiungere un'identificazione a livello di ceppo. Sono stati osservati ceppi con fenotipo diverso, ma al contempo dotati di uno stesso profilo ST. Al contrario ceppi che avevano caratteristiche metaboliche e tecnologiche sovrapponibili hanno presentato poi un genotipo diverso. La maggiore biodiversità genotipica è stata osservata tra i ceppi appartenenti alla specie *Lb. paracasei* (9 ceppi, 7 profili ST), mentre per *Lc. lactis* è stata osservata una minore variabilità (18 ceppi, 10 profili ST). Questa metodica consente quindi di poter eliminare eventuali ridondanze a livello di ceppoteca e poter offrire ai produttori dei ceppi diversi da utilizzare in programmi di rotazione in caseificio, anche in previsione di un'eventuale infezione fagica.

1. Introduzione

Nel complesso processo di caseificazione intervengono fattori di diverso ordine: microbiologico, biochimico, fisico, fisico-chimico, chimico e meccanico. Ogni tipo di formaggio scaturisce da una determinata combinazione di questi fattori. I fattori di ordine microbiologico, che sono peraltro i più difficili da governare, svolgono un ruolo essenziale nella produzione e nella maturazione dei formaggi. L'utilizzo di latte crudo per la caseificazione, se da un lato rappresenta un punto di forza per i formaggi tipici, può contemporaneamente diventarne il punto di maggior debolezza quando la qualità microbiologica del latte non è eccellente, per la scarsa presenza di batteri lattici o per la presenza di microrganismi anticaseari.

La causa del progressivo impoverimento del latte in "batteri caseari" può essere imputata alla maggiore pulizia ed igiene adottate nelle diverse fasi di produzione (mungitura, trasporto del latte e locali di lavorazione) e nell'uso di recipienti e utensili in metallo o in plastica al posto di quelli in legno. Se da un lato queste pratiche risolvono i problemi di tipo igienicosanitario, dall'altro, riducendo il numero di microrganismi che "inquinano" il latte, lo depauperano anche di batteri filocaseari.

Nel caso di formaggi a latte crudo, l'impiego dell'innesto contribuisce a "indirizzare" i processi fermentativi della caseificazione, riducendo l'insorgenza di difetti nel formaggio. Esso assicura, infatti, corrette condizioni di acidificazione e spurgo della cagliata, riducendo la formazione di occhiature ed aromi sgradevoli e comunque indesiderati, consentendo, allo stesso tempo, lo sviluppo equilibrato delle diverse specie microbiche filocasearie che intervengono nel processo di maturazione, garantendo in tal modo la tipicità del prodotto.

Recenti ricerche hanno evidenziato come nelle produzioni tipiche siano presenti microrganismi atipici o biodiversi, non riscontrabili nelle colture selezionate disponibili in commercio, che in fase di caseificazione, possono contribuire al processo di acidificazione, ma soprattutto nel prosieguo della stagionatura sono determinanti nella definizione delle caratteristiche organolettiche dei prodotti tipici. Tali caratteristiche si sono dimostrate dipendenti dalle proprietà tecnologiche dei ceppi che compongono le popolazioni microbiche naturali (attività proteolitiche, aminopeptidasiche, lipolitiche).

Alla luce di queste considerazioni possiamo affermare che stiamo assistendo all'impoverimento della biodiversità microbica. Due sono gli approcci in difesa di questa perdita: uno rivolto al mantenimento della biodiversità presente nel latte e nei prodotti caseari tradizionali a latte crudo; l'altro è rappresentato dalla creazione di una collezione di ceppi batterici autoctoni caratteristici di particolari aree geografica.

L'impiego delle nuove tecniche di indagine molecolare (PFGE, RFLP, AFLP, ribotyping, MLST) ha permesso di evidenziare, all'interno anche della stessa specie batterica di interesse caseario, la presenza di biotipi peculiari di alcune produzioni e quindi legati sia alle caratteristiche dell'ecosistema geografico/ambientale (microrganismi "autoctoni"), sia alla specificità della tecnologia di processo adottata e quindi ad una particolare pressione selettiva indotta dall'uomo. In particolare la presenza a livello di differenti nicchie di produzione artigianali di

biotipi particolari, che risultano anche in grado di adattarsi meglio al processo produttivo, conferma "l'intima relazione" tra tecnologia e microflora caratteristica di un prodotto.

In questo senso la biodiversità presente nelle differenti specie lattiche può essere considerata non solo di interesse per la conoscenza scientifica negli equilibri dei differenti ecosistemi, ma una risorsa di grande rilievo tecnologico per il miglioramento dei prodotti lattiero-caseari.

2. I batteri lattici

I batteri lattici (o LAB) sono un gruppo di microrganismi molto eterogeneo, le cui specie di appartenenza possono presentare caratteristiche morfologiche, metaboliche, di crescita e di adattamento anche molto diverse. Sono procarioti, eterotrofi e chemiorganotrofi, cioè in grado di attingere energia e carbonio da composti organici, Gram-positivi, ubiquitari, immobili, asporigeni, anaerobi microaerofili, cioè ossigeno tolleranti per piccole quantità, privi di catalasi, di riduttasi attiva sui nitrati, di citocromo ossidasi, in grado di produrre grandi quantità di acido lattico attraverso diverse vie di fermentazione dei carboidrati.

All'interno del gruppo si riconoscono specie omofermentanti ed eterofermentanti, con produzione, nel primo caso, prevalentemente di acido lattico, mentre nel secondo anche di alcol etilico, acetaldeide e anidride carbonica come metaboliti primari della fermentazione.

Le diverse specie possono utilizzare, per via fermentativa, vari tipi di zuccheri, soprattutto monosaccaridi, esosi o pentosi e, previa idrolisi, anche disaccaridi come lattosio, saccarosio, maltosio e altri. Tra le varie specie ne esistono alcune in grado di utilizzare, per via fermentativa, anche alcuni acidi organici, come l'acido citrico, l'acido malico e l'acido tartarico (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Cit (+); *Leuconostoc* spp).

Una prima importante discriminazione tra i vari generi viene effettuata sulla base della morfologia poiché si ritrovano sia forme coccacee che bastoncellari.

Nonostante la loro ubiquità, i batteri lattici hanno elevate esigenze nutrizionali e necessitano di substrati ricchi in costituenti idonei per la loro colonizzazione, quali zuccheri, vitamine, composti azotati semplici, sali minerali e altri. Le temperature di crescita nel latte variano tra i 10°C ed i 50°C, per cui si distinguono specie mesofile e termofile (Bottazzi, 1993).

I primi studi riguardanti i batteri lattici risalgono alla seconda metà dell'Ottocento, quando Pasteur isolò per la prima volta i microrganismi responsabili della coagulazione del latte. Successivamente Storch, in Danimarca e Conn, negli Stati Uniti, scoprirono, in maniera indipendente, la capacità dei batteri lattici di migliorare le caratteristiche qualitative del burro, se inoculati nella panna prima della zangolatura. Fu osservato in seguito che lo stesso tipo di microrganismo era coinvolto in molte altre fermentazioni alimentari spontanee.

E' solo però a cavallo della grande guerra che ha avuto inizio la preparazione industriale di ceppi e colture starter. Il loro impiego, quali coadiuvanti tecnologici, rappresenta il primo passo verso il concetto moderno di caseificazione.

Lo strumento principe per la classificazione del gruppo è rappresentato, senza ombra di dubbio, dal lavoro di Orla-Jensen, risalente agli inizi del Novecento, che ha posto le basi sulle quali ancora oggi poggia la moderna tassonomia.

Negli ultimi decenni, grazie a studi di biologia molecolare, sono intervenuti, tuttavia, significativi cambiamenti nella classificazione dei batteri lattici. Le nuove ricerche, riguardanti lo studio del genoma, hanno dato nuovo valore a ciò che già Orla-Jensen avevano intuito nel 1919, e cioè che i batteri lattici costituiscono un gruppo “naturale” di microrganismi. La presenza di enzimi specifici del metabolismo energetico comuni per i differenti generi, infatti, dimostra l’esistenza tra loro di una forte affinità e, quindi, di una stretta relazione filogenetica (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Allo stato attuale, nell’ambito del gruppo dei batteri lattici, sono riconosciute diverse famiglie, generi e specie, ma la classificazione è in continua evoluzione.

E’ ipotizzabile che in un prossimo futuro gli studi si estendano a regioni sempre più ampie di genoma, oggi ancora sconosciute, capaci di regolare specifiche attitudini fisiologiche e metaboliche, nella speranza di poter finalmente stabilire delle relazioni tra il comportamento metabolico di un microrganismo e il suo genoma. Le più importanti famiglie di batteri lattici sono riportate nella tabella seguente (Tabella 1).

Tab.1: Principali famiglie di batteri lattici (Mucchetti e Neviani, 2006)

FAMIGLIA	GENERE
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Lactococcus</i>
<i>Leuconostaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Melissococcus</i> <i>Tetragonococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>

Batteri appartenenti a questi generi si ritrovano normalmente negli alimenti, nei vegetali, nell’intestino dell’uomo e degli animali. Di seguito sono brevemente descritti i generi di maggiore interesse lattiero-caseario.

2.1 Genere *Lactococcus*

Il genere *Lactococcus* riunisce batteri di forma coccacea, anaerobi facoltativi, Gram positivi, mesofili, cioè in grado di crescere a temperature inferiori ai 40°C, immobili, catalasi negativi, normalmente non emolitici, ad eccezione di alcuni ceppi di *Lactococcus lactis*, che mostrano una debole reazione α -emolitica.

Dal punto di vista morfologico il genere *Lactococcus*, si presenta con cellule leggermente ovali, disposte generalmente a coppie (diplococchi) o in corte catene, che si allungano in direzione dello sviluppo della catena stessa. In generale possiamo, comunque, ritenere che la disposizione dei microrganismi sia influenzata dalle condizioni ambientali di sviluppo.

Secondo le recenti tecniche molecolari, le specie appartenenti al genere *Lactococcus* sono: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, subsp. *lactis* e subsp. *hordniae*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* e *Lactococcus raffinolactis* (Mucchetti e Neviani, 2006).

Le specie ritenute di stretto interesse lattiero-caseario sono: *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Figura 1).

Entrambe sono omofermentanti, cioè in grado di produrre acido lattico, nel caso specifico L(+), come prodotto primario della fermentazione dei carboidrati, hanno una temperatura ottimale di crescita intorno ai 30 °C e sono caratterizzate dall'aver in comune il gruppo sierologico (reagiscono con il gruppo N di antisiero).

A differenza degli streptococchi, i lattococchi crescono a 10°C, ma non a 45°C, caratteristica importante che permette di distinguere i due generi.

In passato, veniva individuata una terza subspecie di *Lc. lactis*, ritenuta d'interesse lattiero-caseario, la subsp. *diacetilactis*. La differenza essenziale tra quest'ultima e la subsp. *lactis*, consisteva nella capacità della subsp. *diacetilactis* di metabolizzare l'acido citrico per dare composti aromatici quali acetoino e diacetile. Successivamente, si è scoperto che questa particolare abilità era dovuta alla presenza di un plasmide instabile, che, quindi, una volta perso, rendeva indistinguibili sia fenotipicamente che genotipicamente le due subspecie. Oggi sembra, quindi, opportuno parlare di *Lc. lactis* subsp. *lactis* Cit(+) e *Lc. lactis* subsp. *lactis* Cit(-), a seconda della presenza o assenza del plasmide (Bottazzi, 1993).

Ciò che permette, invece, di differenziare le specie *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, consiste nella perdita della capacità di produrre ammoniaca dall'idrolisi dell'arginina da parte della subspecie *cremoris*, per assenza dell'enzima arginina deaminasi. Altra distinzione tra le due subspecie è effettuata sulla base dell'alotolleranza, poiché la subsp. *cremoris*, a differenza della subsp. *lactis*, è in grado di sviluppare in presenza del 2% di cloruro di sodio e non del 4 % (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994).

Le specie del genere *Lactococcus* si prestano molto bene all'inoculo diretto in caldaia, poiché la loro attività acidificante si attiva già nelle primissime fasi di lavorazione (Salvadori del Prato, 1998).

Per quanto riguarda la produzione di sostanze antimicrobiche, è importante ricordare la capacità di alcuni ceppi della subsp. *lactis* di elaborare nisina, ad "attività anticlostridica",

esplicata esclusivamente in ambiente acido. Questo ha reso possibile il suo utilizzo nelle conserve alimentari a pH inferiore a 6, nei formaggi fusi e nel mascarpone, come conservante, anche se negli ultimi anni va affermandosi sempre più la convinzione che l'impiego non giustificato di sostanze antimicrobiche quali le batteriocine possa portare alla selezione di ceppi antibiotico-resistenti, con possibili conseguenze dannose per la salute umana (Mucchetti e Neviani, 2006).

E' stata, inoltre, purificata una sostanza prodotta da *Lc. lactis* subsp. *cremoris* denominata diplococcina, attiva contro ceppi sia della subsp. *lactis* che *cremoris* e, quindi, assolutamente svantaggiosa dal punto di vista tecnologico, poiché in grado di inibire i microrganismi utili per la fermentazione.

Le specie appartenenti al genere *Lactococcus* sono più soggette all'attacco da parte di batteriofagi, rispetto a quelle appartenenti al genere *Lactobacillus*, come del resto lo sono tutte le specie mesofile, rispetto a quelle termofile.



Fig.1: *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Bottazzi, 1993)

2.2 Genere *Streptococcus*

I microrganismi appartenenti a questo genere furono i primi ad essere individuati dai microbiologi, poiché coinvolti in molte patologie umane ed animali.

Sono batteri Gram positivi, immobili, non sporigeni, aerobi facoltativi, catalasi negativi, disposti generalmente in sequenze ordinate, ricordanti una collana o una catenella (Figura 2), con temperature di crescita comprese tra 25°C e 45°C (optimum 37°C).

A questo genere appartengono diverse specie, riunite in numerosi gruppi, come quello degli streptococchi piogeni, degli streptococchi del primo tratto del cavo orale di uomo e animali e, infine, quello indicato come "altri streptococchi" (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994). E' importante ricordare che alcune specie appartenenti a questo genere sono patogene: vengono generalmente divise in quattro sierotipi (A, B, C, E) ed esplicano un'azione β -emolitica. Nel gruppo A si trovano gli streptococchi patogeni per l'uomo, tra cui *S. pyogenes*, agente eziologico della scarlattina, rinvenuto anche nel latte, a seguito di contaminazione da parte di personale infetto.

L'unica specie di interesse lattiero-caseario è rappresentata da *S. thermophilus*. Si tratta di un microrganismo appartenente al gruppo indicato come "other streptococci" (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994), anche se alcuni autori lo includono in quello degli streptococchi orali in ragione dello stretto rapporto genetico con *S. salivarius* (Farrow *et al.*,

1984). E' omofermentante, produce prevalentemente acido lattico L(+), con temperatura ottimale di sviluppo tra 40°C e 45°C, incapace di crescere a 10°C e resistente a trattamento termico di 60 °C per 30 minuti.

S. thermophilus è una delle specie meglio adattate a crescere nel latte, grazie al suo particolare processo evolutivo, tuttavia, è in grado di fermentare solo pochi carboidrati: mostra, infatti, una spiccata preferenza per i disaccaridi lattosio e saccarosio, mentre è quasi del tutto incapace di fermentare il galattosio. E' stato osservato, però, che se lo sviluppo di *S. thermophilus* avviene in un substrato ricco in galattosio e povero in lattosio, alcuni ceppi sono in grado di metabolizzare fino al 100% del galattosio disponibile. Questo suggerisce che la specie è potenzialmente capace di utilizzare tale zucchero, ma che il gene codificante per questo carattere non si esprime in presenza di un eccesso di lattosio (Tinson *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 1984).

Altra caratteristica peculiare della specie è quella di poter metabolizzare molto rapidamente il lattosio, ma al tempo stesso di crescere lentamente, a causa del suo scarso potere proteolitico. Per questo motivo, nella produzione di starter industriali, è spesso associata a ceppi altamente proteolitici, anche di altre specie, in quanto *Str. thermophilus*, usato da solo come innesto, dà prodotti con buona tessitura e grana, ma di scarso sapore (Bottazzi, 1993).

Classico esempio di utilizzo tecnologico di *Str. thermophilus* è quello che si ha nella produzione dello yoghurt, associato a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Il rapporto che si instaura tra le due specie è sinergico: la prima produce acido formico, che stimola lo sviluppo del lattobacillo, che a sua volta produce composti aromatici e peptidi essenziali per mantenere in vita gli streptococchi (Stiles *et al.*, 1997).

E' stata evidenziata, inoltre, la capacità di *S. thermophilus* di produrre sostanze antibatteriche: dopo il suo sviluppo nel latte, è possibile estrarre con metanolo-acetone, una sostanza fortemente attiva verso *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium capsulatum*, *Salmonella enterica* ser. *Thiopyrumium*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp e *Lc. lactis* subsp. *lactis*. L'estratto attivo è composto da tre diverse frazioni antimicrobiche, termostabili, solubili in acqua, resistenti a temperatura di refrigerazione, non sensibili agli enzimi e di color giallastro.

Studi recenti stanno attualmente portando alla luce il potenziale ruolo tecnologico di un'altra specie appartenente al genere *Streptococcus*, che pur non essendo tra le specie dominanti appartenenti al gruppo dei batteri lattici, spesso si ritrova nei prodotti caseari italiani a latte crudo: *Str. macedonicus* (Pacini *et al.*, 2006).

Alcuni studi hanno messo in evidenza importanti caratteristiche di *S. macedonicus*, quali la produzione di sostanze inibenti *Listeria* spp e/o batteri sporigeni, l'incapacità di decarbossilare gli aminoacidi a formare ammine biogene, l'assenza di attività emolitica e la suscettibilità verso i più comuni antibiotici (Lombardi *et al.*, 2004). Ciò porta ad ipotizzare un possibile razionale utilizzo di *S. macedonicus* nelle miscele starter in un prossimo futuro. Sono necessari, tuttavia, ulteriori studi per definire chiaramente aspetti legati al metabolismo della specie, che potrebbero influenzare le caratteristiche del prodotto finale.

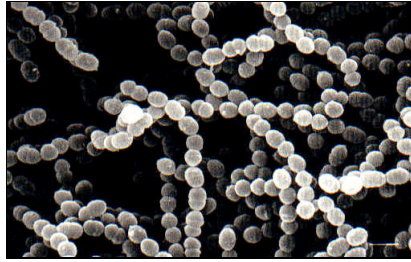


Fig.2: *Str. thermophilus* (da Bottazzi, 1993)

2.3 Genere *Pediococcus*

A questo genere appartengono batteri Gram positivi, anaerobi facoltativi, omofermentanti, in grado di produrre acido lattico prevalentemente dalla fermentazione di monosaccaridi e disaccaridi. Non essendo in grado di fermentare il lattosio, utilizzano il glucosio secondo la via Embden-Meyerhof-Parnas. La loro temperatura di sviluppo ottimale è compresa tra i 25°C e i 40°C; sono gli unici batteri lattici che si dividono su piani ortogonali e si presentano con piccole cellule coccoidi, per lo più a due a due, ma anche con la tipica disposizione a tetrade (Figura 3). Si differenziano dai micrococchi perché non sono catalasi positivi, non sono pigmentati e producono una maggiore quantità di acido lattico; più difficile risulta, invece, la distinzione dagli aerococchi.

Sono molto diffusi nei vegetali e nei loro derivati, nei formaggi maturi, nel pesce, nei prodotti carnei freschi e conservati.

Le specie appartenenti a questo genere sono, secondo la recente tassonomia: *Pediococcus acidilactici*, *Pc. pentosaceus*, *Pc. dextrinicus*, *Pc. parvulus*, *Pc. inopinatus*, *Pc. damnosus*, *Pc. urinaeequi* e *Pc. halophilus*. Quelle di stretto interesse lattiero-caseario sono due: *Pc. acidilactici* e *Pc. pentosaceus* (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994).

Entrambe sviluppano bene su substrati nutritivi ricchi (MRS), agarizzati e non, sia in condizioni anaerobie, che aerobie. Il latte, invece, risulta essere un terreno povero per *Pc. acidilactici* e *Pc. pentosaceus*, per cui, volendo ottenere una buona crescita, occorre supplementarlo con aminoacidi.

Le due specie sono strettamente correlate e la loro distinzione si basa essenzialmente sulle differenze a livello di genotipo, mentre difficilmente possono essere distinte sulla base del profilo fenotipico.

Pc. pentosaceus è un microrganismo termofilo, la cui crescita, tuttavia, si arresta a 50°C, in grado di resistere a valori di pH fino a 4,2 ed a concentrazione di cloruro di sodio fino a 6,5 %. Si tratta di un microrganismo capace di fermentare solamente i pentosi.

Pc. acidilactici si distingue dal precedente perché non fermenta i pentosi, è molto più resistente alle alte temperature (60°C per 30 minuti) ed è capace di sviluppare alla temperatura di 50°C (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1991).

Recentemente sono stati inoltre descritti attacchi da batteriofago nei confronti di *Pediococcus* spp (Yoon *et al.*, 2007).

E' stata evidenziata un'ottima attività di produzione di sostanze antimicrobiche da parte di alcuni ceppi di *Pc. acidilactici*, in grado di produrre particolari batteriocine, dette pediocine. Una ricerca spagnola ne ha dato evidenza: sono state effettuate analisi microbiologiche su un formaggio ottenuto con latte inoculato con *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 e due ceppi di pediococchi produttori di pediocina (Ped+), in associazione con due ceppi di *Lc. lactis* produttori di nisina (Nis+) all'1%. L'attività antimicrobica della pediocina è risultata efficace verso tutte e tre le specie patogene (Rodriguez *et al.*, 2005).

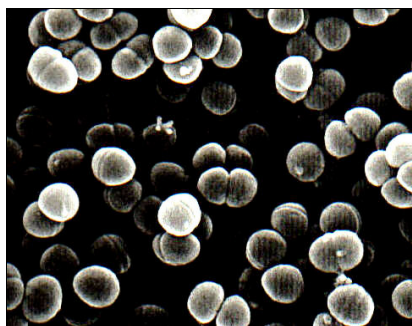


Fig.3: *Pediococcus acidilactici* (da Bottazzi, 1993)

2.4 Genere *Leuconostoc*

Il genere *Leuconostoc* comprende microrganismi Gram positivi, immobili, asporigeni, anaerobi facoltativi, con temperature ottimali di crescita comprese tra i 20°C ed i 30°C, a metabolismo eterofermentante, cioè in grado di produrre non solo acido lattico D(-), ma anche anidride carbonica e alcol etilico dalla fermentazione di mono e disaccaridi. La morfologia è variabile a seconda delle condizioni di sviluppo; in latte con estratto di lievito si presentano normalmente con cellule di forma coccoide formanti catene la cui lunghezza varia in base al ceppo; in brodo, invece, assumono aspetto bacillare (Bottazzi, 1993).

La caratteristica che rende questo genere così importante dal punto di vista tecnologico è la capacità dei microrganismi che ne fanno parte di metabolizzare l'acido citrico, producendo sostanze aromatiche come il diacetile e l'acetoino. Questa peculiarità, tuttavia, è dovuta a geni portati da plasmidi instabili e, quindi, è facilmente perduta nelle colture rinnovate in laboratorio.

Numerose sono le specie appartenenti a questo genere, ma solo tre sono importanti per l'industria casearia: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Leuconostoc lactis*.

Tutte e tre crescono lentamente in condizioni di laboratorio, per lo sviluppo preferiscono substrati nutritivi con l'aggiunta di cisteina-HCl allo 0,05% e condizioni anaerobiche. Il latte risulta essere un substrato povero per questi microrganismi, tanto che per ottenere una buona crescita, spesso, è necessario un supplemento di amminoacidi, estratto di lievito e fruttosio.

Inoltre, non sono in grado di sviluppare in presenza del 3% di cloruro di sodio e a pH 4,8 (Bottazzi, 1993).

Leuconostoc lactis e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* sono specie molto vicine dal punto di vista fenotipico, possiamo però evidenziare che la prima resiste molto meglio alle alte temperature (60°C per 30 minuti), fermenta più rapidamente il lattosio ed è meno esigente, per quanto riguarda il fabbisogno nutritivo, di sostanze azotate.

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* sviluppa a temperature comprese tra 10°C e 37°C e, a differenza delle specie precedenti è in grado di fermentare la salicina (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994). E' spesso utilizzato come starter per produzioni quali creme o burro, in virtù della spiccata capacità di produrre composti aromatici, quali diacetile ed acetoino dal metabolismo dell'acido citrico.

Le specie appartenenti al genere *Leuconostoc* sono frequentemente soggette ad attacco fagico, anche se sono ancora scarsi gli studi in merito (Mucchetti e Neviani, 2006).

2.5 Genere *Enterococcus*

Il genere *Enterococcus* include specie che in passato facevano parte del gruppo degli streptococchi fecali (gruppo N). Sono batteri ubiquitari, caratteristici del tratto enterico di uomo e animali, delle superfici dei vegetali, degli insetti e di animali selvatici (Bottazzi, 1993).

Sono microrganismi Gram positivi, catalasi negativi, a volte mobili per la presenza di flagelli, anaerobi facoltativi, con metabolismo fermentativo. Seguendo la via omofermentante, riescono a metabolizzare un ampio numero di carboidrati con produzione prevalente di acido lattico L(+). Crescono normalmente sia a 10°C che a 45°C (optimum 37°C), resistono a valori di pH pari a 9,6 e concentrazione di cloruro di sodio del 6,5% (Bottazzi, 1993). La loro forma è generalmente sferica e sono spesso riuniti a paia (Figura 4).

Il genere *Enterococcus* racchiude un gran numero di specie con caratteristiche molto diverse tra loro: alcune patogene per uomo e animali ed altre, invece, utili per la trasformazione casearia, quali *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*.

Questi microrganismi, come già detto, sono tipicamente intestinali, ma riescono a sviluppare in numerosi prodotti di origine animale, come latte e carne. Essendo termodurici, infatti, sono in grado di rimanere vitali anche dopo cottura o pastorizzazione. Sono, quindi, microrganismi molto resistenti e difficili da eliminare proprio in conseguenza della loro capacità di adattamento e resistenza a diversi fattori.

Sono considerati microflora tipica di produzioni casearie artigianali a latte crudo (Mucchetti *et al.*, 1982; Neviani *et al.*, 1982), ma il loro significato igienico e tecnologico è spesso discusso. Il punto nodale del dibattito tra igienisti alimentari e casari ruota intorno alla patogenicità di alcuni ceppi, legata all'attività emolitica e alla capacità degli stessi di produrre ammine biogene, in particolare istamina e tiramina (Giraffa *et al.*, 1995). Ulteriore motivo di scetticismo è dato dall'attitudine di alcuni ceppi ad acquisire e trasferire ad altri microrganismi caratteri di resistenza agli antibiotici (Chavers *et al.*, 2003; Moubareck *et al.*, 2003). A questo proposito, è importante ricordare come diversi studi abbiano dimostrato la resistenza verso la vancomicina di alcuni ceppi di *E. faecium* e *E. faecalis* isolati da prodotti caseari, destando notevole preoccupazione all'interno dell'intera comunità scientifica. La vancomicina, infatti, sembra

essere uno tra i pochi antibiotici ancora efficaci nella terapia verso ceppi multi-resistenti. Gli stessi studi hanno, tuttavia, dimostrato che nella maggior parte dei casi la resistenza non è dovuta alla presenza del gene *vanA*, scongiurando così la possibilità di trasferimento della resistenza stessa ad altri microrganismi (Giraffa *et al.*, 2006).

Al tempo stesso, sono ormai noti gli innumerevoli effetti positivi che gli enterococchi esplicano nei prodotti caseari: grazie alla loro spiccata attività lipolitica, alla capacità di utilizzare l'acido citrico e a quella di produrre composti aromatici volatili, influenzano le caratteristiche organolettiche di moltissimi formaggi a latte crudo, di cui spesso rappresentano la flora dominante, insieme a lattococchi ed a *Str. thermophilus*.

Diversi ceppi, inoltre, sono produttori di batteriocine (enterocine) attive contro *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Bacillus spp* ed è stato provato che, se aggiunti come starter o presenti nel latte come *Non Starter Lactic Acid Bacteria* (NSLAB) apportano notevoli miglioramenti nei processi fermentativi di molti prodotti lattiero caseari (Giraffa, 2003).

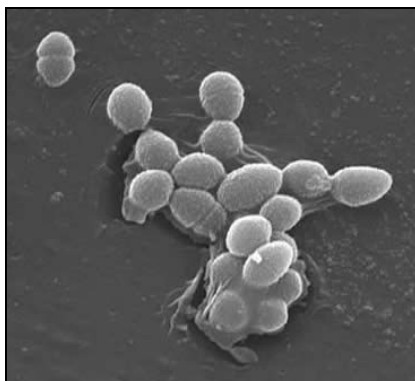


Fig.4: *Enterococcus spp* (da www.sourcemolecular.com)

2.6 Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* riunisce numerose specie, con caratteristiche eterogenee, ampiamente utilizzate nell'industria casearia, in virtù della loro versatilità e dei provati effetti benefici che sono in grado di apportare nei confronti degli animali e dell'uomo, attraverso l'attività probiotica e la produzione di sostanze antibatteriche (Mucchetti e Neviani, 2006).

I lattobacilli sono microrganismi bastoncellari, spesso riuniti a formare corte catene, Gram positivi, anaerobi facoltativi o microaerofili, crescono in ambienti con bassa tensione di ossigeno e in presenza del 5% di anidride carbonica. La loro temperatura ottimale di crescita è compresa tra 30°C e 40°C, sono acidurici e acidofili, in grado di sviluppare a pH non più alto di 7,2 (Bottazzi, 1993). Durante il processo di trasformazione casearia, iniziano generalmente a svilupparsi quando si innalza l'acidità, al contrario dei lattococchi che sviluppano più velocemente ed a valori di pH più elevati (Salvadori del Prato, 1998).

Le esigenze nutritive di questo gruppo sono assai elevate: crescono, infatti, in substrati ricchi e complessi, nei quali trovano fonti energetiche come carbonio, nucleotidi, amminoacidi e vitamine.

Dalla fermentazione dei carboidrati producono prevalentemente acido lattico, ma anche acido acetico, etanolo, anidride carbonica, acido succinico e formico.

Il loro ruolo è di importanza fondamentale nella produzione di formaggi a pasta cotta a temperature superiori a 45°C e nella produzione di latti fermentati come yoghurt, kefir, yakult e *acidophilus milk* (Bottazzi, 1993).

In funzione dell'attività fermentativa si dividono in tre gruppi: lattobacilli omofermentanti obbligati, lattobacilli eterofermentanti facoltativi e lattobacilli eterofermentanti obbligati.

2.6.1 Lattobacilli omofermentanti obbligati

Questa categoria riunisce bacilli lattici che fermentano, secondo lo schema Embden-Meyerhof, gli esosi con formazione di solo acido lattico e non in grado di fermentare i pentosi. Nel gruppo sono comprese le specie afferenti a *Thermobacterium* secondo Orla-Jensen. Quelle di stretto interesse lattiero-caseario sono *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*. All'interno della specie *Lb. delbrueckii* è stata inoltre recentemente scoperta una nuova sottospecie isolata da prodotti caseari indiani: *Lb. delbrueckii* subsp. *indicus* (Dellaglio *et al.*, 2005). Si tratta di bacilli termofili, con temperature ottimali di crescita intorno ai 44-45°C, non in grado di sviluppare a temperature inferiori a 15°C, ampiamente utilizzati nell'industria casearia.

La specie *Lb. helveticus* (Figura 5) è spesso utilizzata in siero-innesto per la produzione di diversi formaggi, come Grana Padano e Parmigiano Reggiano. È termofila, in grado di sviluppare a 52°C ed in presenza di cloruro di sodio a concentrazione pari al 4%. Produce elevate quantità di acido lattico in forma DL, in particolare fino al 2,8%, rispetto al 2% di *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Non è in grado di liberare galattosio a partire da lattosio, caratteristica impiegata per distinguere questa specie da *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* (Bottazzi, 1993).

Lb. acidophilus è stato isolato per la prima volta da feci di neonato, si ritrova nelle feci di uomo adulto e dei mammiferi. È in grado di fermentare diversi zuccheri, tuttavia, ha uno scarso potere acidificante. È largamente impiegato nella produzione di alimenti probiotici lattiero-caseari, in virtù della sua capacità di adesione epiteliale e resistenza ai sali biliari. La maggior parte dei ceppi, inoltre, è dotata di potere antitumorale, esercita attività ipocolesterolemica ed è in grado di produrre batteriocine (acidolina) attive verso germi enteropatogeni e sporigeni (Bottazzi, 1993).

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* fu isolato per la prima volta da yoghurt bulgaro ed è il microrganismo che più spesso si ritrova nei latti fermentati orientali. Il suo sviluppo è strettamente dipendente dal latte, in quanto è in grado di fermentare solo lattosio, fruttosio e glucosio, producendo acido lattico prevalentemente in forma D(-). È ampiamente utilizzato per

la produzione dello yoghurt e di formaggi come Taleggio, Gorgonzola, Asiago, formaggi molli e semicotti, sempre in associazione a *Str. thermophilus*. Tra le sue caratteristiche ricordiamo la spiccata attività proteolitica nei confronti di β -lattoglobulina e il notevole potere acidificante (Bottazzi, 1993).

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* è un microrganismo capace di crescere a temperature pari a 52°C e rappresenta, quindi, la specie termofila per eccellenza. E' in grado di fermentare molti esosi oltre al lattosio e viene spesso utilizzato per la preparazione di colture sostitutive o di rinforzo degli innesti naturali per la produzione di Grana e Provolone, in associazione con altri microrganismi. Rispetto alla subsp. *bulgaricus*, ha uno scarso potere proteolitico, ma al tempo stesso manifesta una più ampia attività aminopeptidasica e dipeptidasica (Salvadori del Prato, 1998).

Lb. delbrueckii subsp. *delbrueckii* non è in grado di fermentare il lattosio, ma solo il fruttosio, il galattosio ed, in alcuni casi, anche il maltosio, per cui trova scarso impiego nell'industria lattiero-casearia. Viene utilizzato per l'acidificazione dei mosti di malto (Salvadori del Prato, 1998).

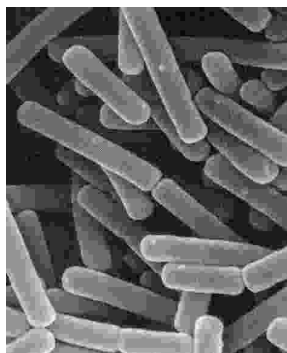


Fig.5: *Lb. helveticus* (www.sourcemolecular.com)

2.6.2 Lattobacilli eterofermentanti facoltativi

Il gruppo racchiude i bacilli lattici in grado di fermentare sia gli esosi che i pentosi, con produzione di diversi metaboliti. Questi microrganismi, infatti, possono, a seconda del tipo di zucchero da fermentare (esoso o pentoso), seguire la via omolattica o eterolattica. Nel primo caso il prodotto finale della fermentazione sarà semplicemente acido lattico, nel secondo, oltre all'acido lattico, si assisterà alla liberazione di anidride carbonica, acido acetico o etanolo ed acido formico. Questo raggruppamento include le specie degli *Streptobacterium* di Orla-Jensen, microrganismi prevalentemente mesofili, con temperature ottimali di crescita intorno ai 30°C, spesso presenti nel latte crudo e nei prodotti carni fermentati. Le specie di stretto interesse lattiero-caseario sono *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*. All'interno del gruppo troviamo però anche numerose altre specie come *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus zae* (Salvadori del Prato, 1998).

Lb. casei (Figura 6) si presenta come un bastoncino corto con estremità quadrate, con tendenza a disporsi in catenelle. La sua crescita si arresta a temperatura di 45°C e produce dalla

fermentazione dei carboidrati acido lattico in forma L(+). E' impiegato nella produzione dello yakult, particolare tipo di latte fermentato, gelati e, altri prodotti lattiero-caseari probiotici, in virtù del dimostrato potere antitumorale e della capacità di stimolazione del sistema immunitario (Bottazzi, 1993). In particolare, sembra che *Lb. casei* sia in grado di attivare le cellule di Kupffer, con produzione di fattori citotossici.

Lb. paracasei presenta caratteristiche del tutto simili a *Lb. casei*, sia sotto il profilo morfologico, che fermentativo, è una specie importante per la maturazione dei formaggi, dotata di una spiccata attività peptidasi e capacità di produrre composti aromatici (Bottazzi, 1993). Nel passato recente *Lb. casei* e *Lb. paracasei* sono state sottoposte ad una estesa revisione tassonomica, che ha portato alla provvisoria eliminazione della specie *Lb. paracasei* e all'incorporamento dei ceppi appartenenti a quest'ultima all'interno della specie *Lb. casei*. Al momento però queste due specie sono ancora considerate separate all'interno del genere *Lactobacillus* (Dellaglio *et al.*, 2002; Desai *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2005; Pot, 2008).

Lb. plantarum è un microrganismo in grado di sviluppare a 15°C, ma non a 45°C, ha una temperatura ottimale di crescita compresa tra 30°C e 35°C, è in grado di colonizzare diversi habitat ed è responsabile della fermentazione lattica nell'insilato di mais. La sua applicazione nell'industria casearia è stata da sempre scarsa. Studi recenti hanno, tuttavia, portato alla luce alcuni interessanti aspetti di questa specie, come la capacità di alcuni ceppi di produrre citochine ad azione antibatterica (Haza *et al.*, 2004).

Lb. rhamnosus, infine, deve il suo nome alla capacità di fermentare il ramnosio con produzione di acido lattico in forma L(-); è l'unico, tra gli appartenenti a questo gruppo, che cresce bene sia a 15°C che a 45°C (Bottazzi, 1993). Trova impiego nell'industria casearia in virtù della spiccata attività probiotica, soprattutto se associato ad altri microrganismi.

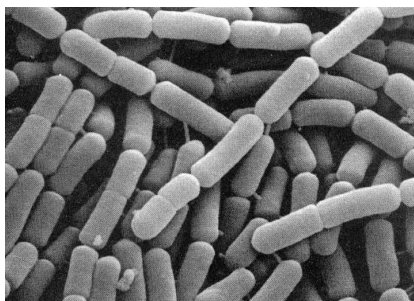


Fig.6: *Lb. casei* (www.sourcemolecular.com)

2.6.3 Lattobacilli eterofermentanti obbligati

Il gruppo è formato dai *Betabacterium* di Orla-Jensen, microrganismi altamente eterogenei, sia per i diversi profili fermentativi, che per l'elevata variabilità genetica. Sono batteri generalmente mesofili, con temperature ottimali di crescita intorno ai 30°C, in grado di fermentare gli esosi in acido lattico, acido acetico o etanolo e anidride carbonica e trasformare i pentosi in acido lattico e acetico (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994). Spesso

sono veicolati nel latte dal caglio o attraverso residui vegetali, con conseguente produzione di elevate quantità di gas in corso di fermentazione degli zuccheri, causando spesso difetti di gusto e gonfiore precoce. A questo proposito, è opportuno ricordare l'importanza che assume l'analisi del caglio, specialmente se artigianale, prima del suo utilizzo (Salvadori del Prato, 1998).

In ogni caso, quando lo sviluppo degli eterofermentanti obbligati è sottoposto a controllo, conferiscono al prodotto aromi e caratteri particolari, ricercati soprattutto nei formaggi a pasta dura (Mucchetti e Neviani, 1996). Le specie più importanti sono *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifermentans* e *Lactobacillus reuteri*.

Lb. brevis è un microrganismo mesofilo, in grado di sviluppare a temperature superiori a 38°C, produrre acido lattico prevalentemente in forma DL e ammoniacale dall'arginina.

Lb. kefir fu isolato da bevande acido-alcoliche a base di latte, come Leben, Kefir, Gioddu, Koumiss e dai granuli del Kefir stesso.

Lb. bifermentans è un particolare microrganismo che, a differenza degli altri eterofermentanti, produce acido lattico attraverso la via omofermentante, per poi trasformarlo successivamente in parte in acido acetico, anidride carbonica e H₂.

Lb. reuteri, infine, è una tipica specie lattica enterica, fino a poco tempo fa considerata un'unica specie fenotipica insieme a *Lb. fermentum*. Tra le sue principali caratteristiche ricordiamo la capacità di produrre un metabolita (reuterina) ad azione antimicrobica nei confronti di diversi batteri, e l'attività ipocolesterolemica (Bottazzi, 1993).

3. Utilizzo dei batteri lattici nell'industria casearia

3.1 Le colture starter

La microflora presente nel latte crudo ha origine dall'ambiente fisico di produzione e può essere considerata, in un certo senso, un'impronta di tale ambiente, facilmente modificabile e arricchibile dai differenti interventi dell'uomo sulla filiera zootecnica e di produzione.

Durante la stabulazione, in relazione all'organizzazione dell'allevamento, gli animali veicolano nel latte i microrganismi presenti in stalla o nel pascolo. Successivamente, solo quelli che trovano condizioni ambientali favorevoli (pH, temperatura, ricchezza del substrato etc.) tenderanno a colonizzarlo, tra questi i batteri lattici e, in particolare, le specie mesofile caratteristiche dell'ambiente. Se vogliamo definire l'entità e la natura della flora microbica presente nel latte crudo, dobbiamo inoltre, considerare le condizioni di raccolta e trasporto al caseificio, le pratiche di raffreddamento o refrigerazione del latte (in stalla ed in caseificio) e tutti gli altri fattori che potrebbero influenzare il *pabulum* microbico presente nella materia prima.

Se si escludono rare eccezioni, come l'utilizzo del latte crudo per il consumo diretto, per la produzione di Grana Padano, Parmigiano-Reggiano e alcuni formaggi tipici, gli equilibri batterici che si instaurano nel latte crudo, sono praticamente stravolti dai trattamenti termici di risanamento effettuati prima della trasformazione, quali la pastorizzazione. In questo modo si

eliminano le flore patogene e anticasearie a favore di una maggiore salubrità e stabilità del prodotto. Al tempo stesso, però, si perdono le caratteristiche organolettiche e, talvolta, nutrizionali della materia prima, con il rischio di ottenere prodotti anonimi, privi di un aroma che li contraddistingua (Salvadori del Prato, 1998).

Per questo, negli ultimi anni, ha assunto sempre più importanza l'industria degli starter o innesti, colture ad elevata concentrazione di batteri lattici aggiunte al latte da trasformare allo scopo di indirizzare i processi fermentativi. L'uso di starter per la produzione di formaggi tipici, specialmente se isolati e selezionati dalla microflora caratteristica di questi stessi formaggi, svolge un ruolo di interesse per stimolarne e indirizzarne la maturazione e diventa essenziale in condizioni in cui la microflora necessaria sia assente o in latte reso paucimicrobico dai trattamenti termici di risanamento.

Nelle zone che possiedono un'antica tradizione casearia si è determinata una selezione naturale di microrganismi per cui, a particolari aree geografiche e tecnologie di produzione corrispondono microflore spontanee, in grado di determinare le caratteristiche di tipicità del prodotto, sicuramente non riproducibili altrove ed in altre condizioni (Lodi, 2003).

Per questo, durante la messa a punto di colture starter per prodotti tipici, è importante isolare i microrganismi da questi stessi prodotti o dalle loro materie prime, al fine di salvaguardare una particolare nicchia ecologica, che altrimenti rischierebbe di essere sostituita da un esiguo numero di colture commerciali. In questo modo è possibile standardizzare sia le produzioni che la loro qualità, senza però perdere le caratteristiche organolettiche peculiari del prodotto (Lodi, 2003).

Con l'aggiunta dell'innesto al latte in caldaia si apportano acidità, micronutrienti, fattori di crescita, enzimi e soprattutto batteri lattici. In questo modo l'innesto sopperisce in maniera adeguata alla scarsa attività microbica del latte trattato termicamente, favorisce l'attività degli enzimi coagulanti riducendo i tempi di coagulazione e, quindi, permette di migliorare la struttura del coagulo e di accelerare la sineresi e lo spurgo.

Gli innesti utilizzati possono essere sotto forma di colture naturali, in siero o in latte, o di colture selezionate e la loro composizione microbiologica può variare in relazione al tipo di formaggio da ottenere. Alle caratteristiche delle colture impiegate sono legate alle peculiarità dei prodotti ottenuti e quindi anche il pregio commerciale che ne deriva.

Come accennato, quindi, le colture di batteri lattici impiegate nell'industria casearia possono essere catalogate in due gruppi principali: colture naturali e colture selezionate. Le prime possono essere realizzate in latte o siero e possono essere composte da batteri lattici mesofili e/o termofili; le seconde vengono preparate con diverse soluzioni tecniche e sono costituite da batteri lattici sia mesofili che termofili, selezionati in laboratorio in virtù di diverse caratteristiche filocasearie.

Per la scelta dello starter in caseificio, è molto importante la suddivisione tra specie mesofile e termofile, in quanto la scelta stessa dipende dalla temperatura a cui sarà sottoposto il latte in caldaia. I termofili saranno in grado di resistere a temperature superiori ai 40°C (*Str. thermophilus*, alcune specie di *Lactobacillus* spp e *Pediococcus* spp), mentre i mesofili saranno

in grado di sviluppare solo se le temperature applicate si manterranno al di sotto dei 40°C (*Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp ed alcune specie di *Lactobacillus* spp). Il genere *Enterococcus*, essendo in grado di sviluppare bene sia a basse che ad elevate temperature, viene considerato come gruppo a sé stante; le specie appartenenti a questo genere sono, infatti, definite come mesofile termoduriche (Salvadori del Prato, 1998).

Nella produzione di formaggi italiani, gli starter che trovano maggior impiego sono costituiti da colture termofile e sono caratterizzati dalla presenza di lattobacilli e streptococchi.

Molto diffuso è ancora l'utilizzo di colture naturali, sia in siero che in latte, impiegate soprattutto per la produzione dei grandi formaggi italiani a diffusione internazionale, come Grana Padano e Parmigiano Reggiano (Bottazzi, 1993; Rossetti *et al.*, 2008).

Gli starter naturali sono considerati maggiormente resistenti all'infezione fagica, poiché costituiti da un mix di ceppi che sono stati in grado di sviluppare anche in presenza di fagi presenti nell'ambiente. La fluttuazione nella composizione degli starter naturali, tuttavia, dà luogo a performance variabili e questo può talvolta creare degli inconvenienti durante i processi produttivi. Gli starter naturali possono essere diversi in base al substrato utilizzato per la loro preparazione (latte, siero, scotta).

Le **colture naturali** rappresentano il caposaldo della tecnologia casearia italiana, in particolare delle produzioni tipiche, che rappresentano all'incirca il 40% di tutto il latte trasformato. Il loro utilizzo è diffuso soprattutto nella produzione di formaggi a lunga stagionatura realizzati con latte crudo, quali Grana e Provolone, in cui si impiegano siero-innesti la cui microflora dominante è rappresentata soprattutto da lattobacilli termofili; nella produzione di formaggi molli a partire da latte pastorizzato come la crescenza, o nella lavorazione della mozzarella, si fa uso, invece, di latte-innesti costituiti da *Str. thermophilus* associato con lattobacilli mesofili (Salvadori del Prato, 1998).

In passato i prodotti caseari erano ottenuti mediante processi di lavorazione artigianali che richiedevano l'impiego di molto tempo e che favorivano una selezione naturale a carico della microflora presente nel latte crudo, attraverso i vari passaggi del processo produttivo. La necessità di standardizzare i processi di lavorazione, abbreviandone i tempi, e la volontà di ridurre i difetti di origine microbica, hanno posto le basi per l'affermarsi dell'utilizzo degli innesti naturali. Le prime applicazioni di colture naturali, in siero o in latte, risalgono alla fine dell'Ottocento, quando si individuò nell'innesto un valido metodo per indirizzare le fermentazioni della cagliata.

La microflora presente negli innesti naturali si sviluppa semplicemente per selezione naturale a partire dai batteri lattici naturalmente presenti nel latte crudo e da quelli addizionati come starter, in relazione sia ai trattamenti termici imposti dal processo produttivo, che dal substrato impiegato per la preparazione.

Il sieroinnesto naturale è ottenuto mediante incubazione, alla temperatura prescelta, del siero residuo dalla caseificazione del latte del giorno precedente. Nel caso di formaggi a pasta cotta, la preparazione del sieroinnesto avviene prelevando dalla caldaia il siero a fine caseificazione, questo è successivamente posto in appositi contenitori, dove è portato a temperatura di circa

55°C e, quindi, fatto raffreddare fino alla temperatura di 30°C durante la notte. Questo processo porta alla selezione di una particolare microflora, differenziata sia in specie che in biotipi, resistente alle elevate temperature, fortemente acidificante, l'unica in grado di adattarsi perfettamente alle condizioni venutesi a creare nel substrato di crescita. Le specie caratteristiche del sieroinnesto sono, dunque, forme bacillari ad alta termofilia, quali *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis*. La caratteristica dei formaggi che prevedono l'impiego di sieroinnesto naturale è l'ininterrotto "legame microbiologico" che si viene a stabilire tra le caseificazioni che si susseguono giorno dopo giorno (Mucchetti e Neviani, 2006).

Un altro tipo di coltura naturale in siero è rappresentata dallo scottainnesto, per il quale il substrato di sviluppo è rappresentato dal siero che residua dalla lavorazione della ricotta (scotta). Il suo utilizzo ha conosciuto una larga diffusione negli ultimi vent'anni, soprattutto in Sardegna, ed è caratteristico nella produzione del Pecorino Romano. La base microbiologica dello scottainnesto è costituita da un'associazione di bacilli e streptococchi termofili, anche se il contenuto in batteri è sempre piuttosto scarso. Il processo di produzione dello scottainnesto prevede la normale estrazione della ricotta dal siero residuo dalla caseificazione, che si ottiene in ambiente leggermente acido, a temperatura di 80-90°C, in circa 20-30 minuti. Una parte della scotta residua è trasferita in un apposito recipiente e lasciata raffreddare spontaneamente fino a 45°C per 24 ore, con conseguente acidificazione, ottenendo, in tal modo, lo scottainnesto (Mucchetti e Neviani, 2006).

Ultimo esempio di coltura naturale è quello del lattoinnesto, molto utilizzato nella preparazione di alcuni tipi di formaggio come crescenza, robiole e Taleggio prodotti in maniera artigianale. La composizione microbiologica del lattoinnesto naturale è assai complessa, poiché vi partecipano sia specie mesofile che termofile, forme bacillari e cocciche, rappresentate generalmente da *Str. thermophilus*, *E. faecium* ed *E. faecalis*, *Lb. casei* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis*.

Le operazioni seguite per la produzione del lattoinnesto sono di solito semplici ed iniziano con la termizzazione del latte crudo a 60-65°C per 15-30 minuti; segue un rapido raffreddamento fino alla temperatura prescelta per l'incubazione, di solito compresa tra 40°C e 45°C, si procede poi con l'incubazione stessa, per circa dieci ore, fino ad ottenere il lattoinnesto da utilizzare. Le condizioni di incubazione, più o meno termofile, completano la selezione operata dal riscaldamento e, comunque, variano a seconda del tipo di formaggio da produrre (Mucchetti e Neviani, 2006).

La complessità biologica della miscela di microrganismi che caratterizza gli innesti naturali rappresenta, allo stesso tempo, sia la forza che la debolezza di queste colture preparate direttamente dai caseifici con metodi artigianali. La presenza di diverse specie e biotipi, infatti, rende difficilmente standardizzabile la riproduzione quotidiana dell'innesto da utilizzare, di conseguenza anche la sua attività risulta essere maggiormente variabile, con un evidente riflesso sulle produzioni. Al contempo, questa grande biodiversità permette una maggiore capacità di adattamento alle diverse tecnologie di caseificazione dei formaggi a latte crudo e

artigianali ed una risposta positiva a seguito di modificazioni di fattori esterni, come la composizione microbiologica del latte, l'eventuale presenza di sostanze inibenti la crescita batterica e tutto ciò che è difficilmente standardizzabile in produzione (Lodi, 2003).

Le **colture selezionate** sono costituite, invece, da una miscela di batteri lattici in latte o siero sterili, realizzate in laboratorio da industrie specializzate, sulla base dei risultati di test di caratterizzazione tecnologica (temperatura di crescita, potere acidificante e proteolitico etc.), effettuati su singoli ceppi o miscele di ceppi, isolati da habitat naturali o da colture naturali. Possono essere utilizzati in forma liquida, liofilizzata, cioè in polvere a lunga conservazione, o congelata in azoto liquido (Salvadori del Prato, 1998). La loro utilizzazione nel settore caseario, coincide, generalmente, con la pratica del trattamento termico di risanamento del latte crudo e con la necessità di standardizzare sia le tempistiche di lavorazione, che la qualità dei prodotti, prerogative indispensabili per le produzioni su larga scala. Queste colture, infatti, garantiscono quella riproducibilità di performance, che manca negli innesti naturali.

L'impiego di questo tipo di colture è ormai una pratica consolidata tanto nelle grandi industrie, quanto nei piccoli caseifici artigianali, soprattutto per la produzione di formaggi a latte pastorizzato o termizzato, nei quali si intende ripristinare la microflora caratteristica della materia prima. Ultimamente si stanno affermando sempre più le colture selezionate ad inoculo diretto, che non necessitano di operazioni di replicazione, a vantaggio di una maggiore praticità d'uso. I limiti nell'applicazione delle colture selezionate sono dovuti alla minore diversità biologica e alla maggiore sensibilità all'infezione fagica, per cui sono spesso utilizzate a rotazione, seguendo precisi calendari, proprio per limitare l'incidenza dell'attacco fagico (Salvadori del Prato, 1998).

In Italia, le colture starter selezionate di maggiore impiego sono costituite da batteri lattici termofili oppure da miscele di lattococchi mesofili: associazioni di diversi biotipi di *Str. thermophilus* sono utilizzati per crescenza, mozzarelle, Italico, Pecorino Toscano e altri formaggi molli; miscele di *Str. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sono utilizzate nella produzione di yoghurt, Taleggio, Gorgonzola, Asiago, formaggi molli e semicotti; *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* fungono spesso da colture sostitutive o di rinforzo degli innesti naturali di Grana Padano e Provolone; *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Leuconostoc* spp sono, invece, spesso utilizzati per burro, caprini freschi, Pecorino Toscano e altri formaggi di pecora.

Le **colture lattiche selezionate** standardizzate, pure o composte da miscele di specie o ceppi, in forme varie, sono utilizzate sia per la produzione di latte fermentato in caseificio, che per l'inoculo diretto in caldaia. Questi starter possono essere reperiti sul mercato sotto forma di starter semidiretti e di starter ad inoculo diretto. Le colture selezionate commerciali possono inoltre essere usate per arricchire latte-innesti o siero-innesti naturali.

Gli inoculi semidiretti sono colture selezionate in forma liofilizzata o congelata per la produzione di fermento liquido, utilizzati previa riattivazione. In caseificio vengono sciolti in acqua in ragione del 9-10% ed aggiunti in terreni di coltura, generalmente costituiti da latte vaccino pastorizzato alla temperatura di 90-95°C per 30 minuti; la miscela così ottenuta è,

successivamente, fatta raffreddare alla temperatura di inoculo e di incubazione ottimale, in relazione al tipo di coltura utilizzato. Di solito, per le colture mesofile si incuba a temperatura di 20-23°C per 14-20 ore, mentre per la microflora termofila si procede ad incubazione a 40-45°C per 6-8 ore. Il semidiretto liofilizzato risulta essere più pratico di quello congelato, in quanto non richiede la catena del freddo ed ha una durata di 6-12 mesi a temperatura di refrigerazione (+ 4°C), ricordando sempre che dopo una conservazione prolungata, si avrà una fase di latenza dei microrganismi più lunga. Il congelato richiede, invece, la catena del freddo (da -20°C a -45°C), ma la sua riattivazione risulta essere più veloce rispetto a quella dei liofilizzati. L'inoculo semidiretto è, spesso, utilizzato per essere addizionato ad innesti naturali, come lattoinnesti per Crescenza o sieroinnesti per Grana e Provolone, al fine di arricchire la microflora naturale. Gli inoculi diretti sono costituiti da batteri lattici selezionati in forma liofilizzata o congelata ad elevata concentrazione, pronti per l'uso diretto in caldaia. Anche in questo caso, le due forme, liofilizzata e congelata, hanno ciascuna pregi e difetti: la forma liofilizzata è più pratica, se vogliamo considerare l'aspetto della conservazione e della distribuzione; quella congelata, però, permette di raggiungere risultati migliori, in quanto il congelamento ha un impatto minore sul profilo metabolico dei microrganismi e permette di conservare al meglio la miscela di partenza (Salvadori del Prato, 1998).

Per quanto riguarda il mercato delle colture commerciali in Italia si fa prevalentemente uso di batteri lattici termofili (*Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* e *Lb. helveticus*), eccetto in alcuni tipi di produzioni, come caciotta, Pecorino Toscano e formaggi caprini, per le quali si predilige uno starter mesofilo.

Str. thermophilus è utilizzato come starter in tutti quei formaggi caratterizzati da un aroma dolce, poco accentuato, nei quali si ricerca il gusto del latte e che presentano pasta chiusa, con struttura uniforme nel centro e nel sottocrosta, acidificazioni spinte inizialmente e rapide, che difficilmente scendono nella pasta a valori di pH inferiori a 5, con conseguente scarsa demineralizzazione della cagliata (mozzarella, caciotta, Italiceo, Casatella etc.).

Str. thermophilus e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sono, invece, utilizzati in associazione nella produzione di yoghurt, Taleggio, Gorgonzola: lo streptococco funge da starter per il lattobacillo, che trae vantaggio dai metaboliti prodotti dal primo per moltiplicarsi. I due microrganismi riescono insieme a dare dei valori di acidità titolabile più elevati, con un pH che può arrivare fino a 4,7-4,9. A seconda del rapporto cocchi/bastoncelli si possono modulare la demineralizzazione della cagliata, l'aroma del prodotto, comunque marcato e deciso, ed ottenere una struttura della pasta più o meno gessosa e friabile.

Per quanto riguarda la microflora mesofila, fino a qualche anno fa, venivano impiegate miscele di ceppi così allestite: due ceppi acidificanti (*Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) e due aromatizzanti (*Lc. lactis* subsp. *lactis* Cit (+) e *Leuconostoc* spp). Oggi si tende invece a parlare di starter mesofili di tipo "O" e di tipo "DL": i primi sono caratterizzati dalla produzione esclusiva di acido lattico e vengono impiegati nella produzione di formaggi a pasta chiusa, dura e gessata; i secondi si contraddistinguono per l'elevata produzione di anidride carbonica e di aromi, che si sviluppano in corso di acidificazione. A differenza dei termofili, le colture mesofile

danno acidificazione lenta, con forte demineralizzazione della cagliata, raggiungendo valori di pH pari a 4,7-4,8 e conferendo, inoltre, aroma ed una leggera occhiatura.

Parlando di starter, è importante sottolineare la differenza tra associazione e miscela microbica, in quanto nel primo caso i microrganismi sono simbiotici e tendono a mantenere più o meno costante il loro rapporto, anche dopo svariate repliche; nel secondo, invece, i microrganismi sono scelti per particolari caratteristiche metaboliche, ma non è detto che il loro rapporto si mantenga lo stesso a seguito di passaggi successivi. E' frequente, infatti, che una componente della miscela venga totalmente a mancare.

3.2 Le colture secondarie

Le colture starter (o primarie) vengono utilizzate in virtù del loro metabolismo acidificante. Oltre a queste possono essere usate ulteriori colture selezionate, con scopi diversi da quello dell'acidificazione del mezzo. Le colture secondarie infatti sono utilizzate al fine di abbreviare i tempi di stagionatura, produrre aromi particolari, contribuire al controllo dei germi patogeni e/o alteranti ed eventualmente offrire benefici per la salute del consumatore.

Questi tipi di LAB costituiscono una porzione significativa della microflora non starter di molte varietà di formaggi durante la stagionatura e costituiscono un *fingerprinting* microbico per molti formaggi tradizionali. Sono rappresentati soprattutto da lattobacilli eterofermentanti facoltativi mesofili. Le specie più frequentemente isolate dal formaggio sono *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. curvatus* (Chamba e Irlinger, 2004).

Questi microrganismi possono quindi essere selezionati ed aggiunti al latte da caseificare quali colture secondarie, al fine di intensificare la proteolisi secondaria e quindi l'aroma soprattutto di prodotti a lunga stagionatura (Herrerros *et al.*, 2007; Antonsson *et al.*, 2003). Il significato della presenza dei lattobacilli eterofermentanti nel formaggio è tuttavia controversa. Secondo alcuni Autori questi microrganismi potrebbero essere responsabili di molti difetti nel formaggio (Herrerros *et al.*, 2007), secondo altri invece l'aggiunta di questo tipo di colture potrebbe inibire la crescita di microbi alteranti e in tal modo prevenire l'insorgenza di difetti (Settanni *et al.*, 2010). I ceppi che potrebbero potenzialmente essere utilizzati come colture secondarie hanno innumerevoli proprietà, di conseguenza anche i criteri di selezione per il loro impiego possono essere i più diversi. Il catabolismo degli aminoacidi, la produzione di composti aromatici e specialmente l'attività glutammato-deidrogenasica, sembrano essere attività determinanti per la scelta di ceppi di lattobacilli eterofermentanti facoltativi mesofili, quali colture secondarie. Tanous *et al.* (2002) hanno mostrato che circa la metà dei ceppi di *Lb. plantarum* e di *Lb. paracasei* isolati dal formaggio ha attività glutammato-deidrogenasica. Mancano tuttavia studi comparativi sul comportamento di un determinato ceppo in differenti tipi di formaggio; questi studi potrebbero infatti fornire importanti informazioni su come le condizioni di produzione (tecnologia di caseificazione, velocità di raffreddamento, temperatura di stagionatura etc.) e l'interazione con gli starter primari possano favorire o danneggiare la crescita delle colture aggiunte e influenzarne le attività enzimatiche.

3.3 Le colture probiotiche

Il termine probiotico venne coniato nel 1965 da Lilly e Stillwell. Etimologicamente deriva dall'unione della preposizione latina pro (a favore di) e dell'aggettivo greco βιωτικός (derivante a sua volta dal sostantivo βίος, vita). Quindi un probiotico è un agente che influenza in modo benefico la salute dell'ospite che lo accoglie. Nel corso degli anni sono state proposte varie definizioni di probiotico, tutte concordanti nello specificare che tale agente benefico deve essere vitale. La definizione di probiotico non comprende quindi tutti gli agenti chimici o bioterapeutici che effettivamente non sono vitali, pur avendo effetti benefici sugli organismi. Secondo la definizione ufficiale del testo unificato FAO/WHO del 2006 i probiotici sono "organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite" (Guarner e Schaafsma, 1998). Quindi si pone l'attenzione non solo sulla vitalità, ma anche sul consumo che deve essere costante, al fine di ottenere i benefici richiesti. Una definizione più ampia di probiotico, comprendente anche le risposte dell'ospite può essere: "preparazioni microbiche vitali o prodotti alimentari contenenti un singolo ceppo o una miscela di differenti colture, che, introdotti con la dieta in numero sufficiente, sono in grado di esercitare un effetto benefico sulla salute dell'uomo, tramite la modulazione dell'immunità mucosale e sistemica, così come attraverso il miglioramento del bilanciamento nutrizionale e microbico nel tratto intestinale" (Torriani e Marzotto, 2007). I microrganismi probiotici attualmente utilizzati appartengono per lo più ad alcune specie dei generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Holzapel *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998), tuttavia sono utilizzate anche altre specie batteriche, tra le quali *E. faecium*, *Bacillus clausii*, *Propionibacterium freudenreichii* e lieviti, come *Saccharomyces boulardii*. E' doveroso sottolineare che le caratteristiche di probioticità sono ceppo-specifiche, quindi la loro ricerca non si limita allo studio delle caratteristiche di specie, ma riguarda anche la valutazione dei diversi ceppi all'interno di una stessa specie. Allo stesso modo, non è possibile attribuire a tutta una specie le proprietà probiotiche riscontrate in un singolo ceppo. Le principali proprietà che un microrganismo probiotico deve avere sono la capacità di dare dei benefici all'ospite ed essere vivo e vitale all'interno del corpo dell'ospite stesso. Per valutare tali caratteristiche sono necessari studi *in vitro* sulla resistenza dei microrganismi al passaggio nel tratto gastro-enterico umano. Viene quindi testata la resistenza nei confronti delle diverse barriere fisiche che il nostro corpo interpone a partire dall'ingresso nel cavo orale fino all'intestino. La resistenza al passaggio nel tratto orale viene valutata tramite il saggio della resistenza nei confronti di enzimi dotati di attività battericida presenti nella saliva stessa, quali il lisozima. In seguito vengono testate la resistenza al pH gastrico ed ai sali biliari. Infine viene valutata la capacità di aderire a cellule intestinali umane. Queste valutazioni *in vitro* possono dare una visione preliminare di come il ceppo si comporterà una volta all'interno dell'organismo ospite. Oltre a queste caratteristiche, un ceppo probiotico deve anche essere sicuro (microrganismi detti GRAS, *Generally Recognized As Safe*) ed avere caratteristiche che ne assicurino un beneficio ad ampio raggio per l'ospite, interagendo anche con il sistema immunitario. Lo studio dell'attività dei microrganismi

nell'ecosistema intestinale è quindi un argomento molto complesso e di non facile dimostrazione.

Molte ricerche hanno puntato l'accento su come i probiotici possano influenzare in modo attivo o passivo la risposta benefica nell'ospite. La prima azione benefica certa è data dalla colonizzazione dell'epitelio intestinale che fornisce una barriera attiva alla colonizzazione da parte di patogeni endogeni ed esogeni (competizione biologica). È stato dimostrato che ceppi di lattobacilli e bifidobatteri hanno l'abilità di instaurare una connessione con il muco intestinale (Van Tassel e Miller, 2011) prevenendo così l'adesione di batteri enteropatogeni (Jin *et al.*, 2000). Numerosi studi dimostrano inoltre che i probiotici svolgono un importante ruolo nella prevenzione di alterazioni della permeabilità paracellulare (Caplan *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 1993).

Oltre che entrare in competizione con i patogeni potenziali, i probiotici agiscono sull'ecosistema intestinale stimolando i meccanismi immunitari della mucosa stessa. L'epitelio intestinale è specializzato nell'assorbimento e nel trasporto degli antigeni per l'induzione di una risposta immunitaria adattiva, basti pensare che circa il 60% delle cellule immunitarie si trovano nella mucosa intestinale. Le IgA secretorie attivamente prodotte dall'intestino giocano un ruolo centrale nell'immunità locale e hanno un ruolo significativo nel creare una barriera contro l'infezione da batteri patogeni o virus. I batteri probiotici giocano un importante ruolo incrementando le IgA secretorie (Bautista *et al.*, 2001; Erickson *et al.*, 2000; Fukushima *et al.*, 1998; Kaila *et al.*, 1992). Alcuni dati indicano che i probiotici sono anche capaci di modulare la produzione di IgE (Isolauri, 2011) e di citochine (Cross *et al.*, 2004).

L'azione dei probiotici ha quindi degli effetti benefici diretti sulla salute dell'ospite, tra questi anche la riduzione dell'incidenza e della severità della diarrea. Si hanno dei notevoli miglioramenti per il controllo di disordini intestinali come la Sindrome dell'Intestino Irritabile (SII) e la Malattia Infiammatoria Intestinale (MII). Lo stimolo immunitario apportato dai probiotici è anche correlato a un aumento dell'immunità innata e alla riduzione delle allergie alimentari nei neonati. Oltre agli effetti correlati a stimoli fisiologici, che aumentano le difese umorali, e a interazioni fisiche, che aumentano le difese meccaniche, si hanno anche effetti benefici correlati al metabolismo stesso dei probiotici. A seconda dei ceppi utilizzati possiamo avere vari effetti sull'ospite. I principali sono il rilascio di vitamine e di acidi grassi a corta catena nell'intestino e la diminuzione delle reazioni tossiche o mutagene a livello intestinale. Questi ultimi due fattori sono stati correlati, con dati comunque controversi, ad un'effettiva riduzione dei fattori di rischio del cancro al colon. Un altro effetto benefico correlato al metabolismo dei microrganismi probiotici è quello correlato con la capacità di questi microrganismi di idrolizzare il lattosio, portando ad un aumento della sua tolleranza (Levri *et al.*, 2005; de Vrese *et al.*, 2001).

Un ulteriore effetto benefico è dato dalla possibilità dei microrganismi probiotici di secernere enzimi che deconiugano i sali biliari. Questo consente ai microrganismi stessi di poter sopravvivere nell'intestino. Conseguentemente, la deconiugazione dei sali biliari causa nell'ospite un abbassamento del livello di colesterolo.

Lo studio degli effetti che i probiotici inducono nell'ospite è evidentemente molto vasto. Inoltre, impiegando lo stesso ceppo microbico, non solo si possono avere effetti diversi in funzione dell'ospite, ma in qualche caso, si può anche avere una variazione della risposta dello stesso paziente sottoposto allo stesso trattamento con probiotici in due momenti diversi (Aureli *et al.*, 2010; Guarner *et al.*, 2010; Marangoni e Poli, 2010; de Vrese e Schrezenmeir, 2008).

I microrganismi probiotici tuttavia sono spesso inappropriati come colture starter, poiché le condizioni di crescita nel tratto gastrointestinale sono molto diverse da quelle presenti in una matrice alimentare. Devono essere considerati inoltre i diversi aspetti tecnologici importanti per le colture starter, come, ad esempio, l'attività acidificante, l'attività proteolitica, la capacità di conferire proprietà sensoriali gradevoli al prodotto e la resistenza ai fagi.

In generale, le tecnologie usate nei processi industriali possono influenzare significativamente la funzionalità dei probiotici. La concentrazione stessa di microrganismi utilizzati è diversa a seconda delle applicazioni: una volta inoculati nel latte gli starter presentano generalmente una concentrazione di 10^7 ufc/ml, mentre le cariche microbiche utilizzate nei prodotti probiotici sono più elevate. Tuttavia, molti ceppi probiotici di *Lb. casei* e *Lb. plantarum* sono capaci di crescere in matrici casearie e potrebbero essere impiegati piuttosto come colture secondarie. In questi casi, oltre al beneficio funzionale, i probiotici svolgerebbero anche una funzione tecnologica. *Lb. plantarum* nello specifico è un batterio lattico versatile, isolato da molte nicchie ecologiche e che potrebbe essere impiegato come coltura secondaria nella produzione di formaggi, come coltura starter in prodotti carnei ed in una larga quantità di prodotti fermentati vegetali. *Lb. plantarum* si trova normalmente nel tratto gastrointestinale umano, è sicuro per il consumo umano e talvolta capace di esercitare effetti probiotici sul consumatore (de Vries *et al.*, 2006). Diverse applicazioni di *Lb. plantarum* coinvolgono la fermentazione di substrati vegetali (Wouters *et al.*, 2013; de Vries *et al.*, 2006). *Lb. plantarum* si ritrova inoltre in un cospicuo numero di prodotti tradizionali caseari, come formaggi e latti fermentati (De Angelis *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2008; Ercolini *et al.*, 2003). Per queste ragioni, questa specie sta riscuotendo un grande interesse per lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali, basati sul potenziale probiotico e sulla caratteristica non trascurabile di adattabilità e versatilità in differenti substrati alimentari (Turchi *et al.*, 2013; Zago *et al.*, 2012).

Altri microrganismi con dimostrate proprietà probiotiche ed abilità nel crescere in prodotti caseari sono specie appartenenti al cosiddetto *casei group*, quali *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus*.

Il formaggio rappresenta una matrice alimentare molto interessante per l'incorporazione di batteri probiotici. Vinderola *et al.*, nel 2000, hanno osservato che *Lb. casei* usato come starter in un formaggio probiotico prodotto in Argentina (*Fresco cheese*) era capace di crescere sia durante il periodo di stagionatura, che nel periodo di stoccaggio (in condizioni di refrigerazione). In questo contesto, tale ceppo probiotico ha dimostrato la capacità di agire come starter secondario ed allo stesso tempo rappresentare una coltura funzionale. In modo simile, altri lattobacilli (*Lb. fermentum* e *Lb. rhamnosus*) possono essere usati nella caseificazione con questo duplice scopo. Come conseguenza, i formaggi contenenti questo tipo

di lattobacilli probiotici mostrano anche un certo miglioramento dell'intensità di aroma (Briggiler Marcò *et al.*, 2007; Bude Ugarte *et al.*, 2006). Molto spesso i ceppi probiotici sono combinati con colture starter tipiche dello yogurt per permettere la produzione di prodotti fermentati dalle proprietà nutrizionali e soprattutto sensoriali superiori. Le classiche colture starter da yogurt, *Str. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus* non fanno normalmente parte della microflora indigena dell'intestino dei mammiferi, tuttavia mostrano, in generale, una certa sopravvivenza al passaggio gastro-intestinale (Mater *et al.*, 2005). Recenti studi hanno inoltre mostrato che questi microrganismi possono rilasciare enzimi, le β -galattosidasi, che migliorano la digestione del lattosio nell'intestino e contribuiscono al normale sviluppo del sistema immunitario della mucosa intestinale (de Moreno e Perdigòn, 2005; Guarner *et al.*, 2005). Recentemente, la capacità di attivazione della risposta immunitaria della mucosa intestinale (nello specifico sulla produzione di cellule IgA) è stata evidenziata per diversi ceppi di *Lb. delbrueckii* e loro mutanti spontanei fago-resistenti. Per questi stessi ceppi sono state inoltre evidenziate proprietà tecnologiche adeguate per l'utilizzo come colture starter (Guglielmotti *et al.*, 2007, Guglielmotti *et al.*, 2006). In conclusione, anche se la caratteristica più importante dei batteri probiotici è il loro contributo per la salute dell'ospite, la valutazione del loro comportamento tecnologico sta diventando un parametro chiave per la selezione razionale di ceppi da impiegare in nuovi prodotti.

3.4 Le colture protettive

Le colture protettive sono colture di microrganismi che mostrano attività antimicrobica contro batteri patogeni o alteranti. Alcuni ceppi di batteri lattici sono in grado di produrre sostanze naturali caratterizzate da attività antimicrobica, quali acidi organici, anidride carbonica, acqua ossigenata, diacetile, etanolo e proteine antimicrobiche (batteriocine). Per questa ragione, tali microrganismi, aggiunti alla materia prima da trasformare, sono in grado di prevenire o ridurre la proliferazione di germi indesiderati. Molte ricerche relative alle batteriocine prodotte dai LAB nel formaggio si sono concentrate, ad esempio, sul controllo di *Listeria monocytogenes* e sulla prevenzione del gonfiore tardivo nel formaggio, difetto causato dalla presenza di clostridi (Milillo *et al.*, 2013; Grattepanche *et al.*, 2008). Ceppi di *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* e *Lb. rhamnosus* sono in grado di produrre batteriocine attive contro clostridi, *Staphylococcus aureus*, e *Listeria* spp (Chamba e Irlinger, 2004). Ceppi utilizzati come colture starter primarie o secondarie possono essere utilizzati anche come colture protettive, qualora in grado di produrre sostanze antibatteriche. La loro applicazione nel formaggio può dipendere dal tipo di microrganismi che si intende utilizzare, dal tipo di prodotto realizzato e dallo spettro di attività degli antimicrobici liberati dalla coltura stessa. All'interno del gruppo delle sostanze antimicrobiche prodotte dai LAB, le batteriocine sono le più studiate ed utilizzate nell'industria casearia. Le batteriocine prodotte dai LAB sono costituite generalmente da peptidi cationici, di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi e che, in seguito a fenomeni di scissione, si trasformano nelle molecole biologicamente attive. La loro azione antibatterica è rivolta soprattutto nei confronti di batteri Gram positivi. In particolare la prima

batteriocina, approvata nel 1988 dall'FDA (*Food and Drug Administration*) in qualità di bioconservante, è stata la nisina, sostanza antimicrobica prodotta da *Lc. lactis* e appartenente alla classe dei cosiddetti lantibiotici. Sono state caratterizzate anche altre batteriocine prodotte dai LAB, specialmente quelle prodotte da *Str. thermophilus*, *Str. macedonicus* ed enterococchi, che possono essere utilizzate nel formaggio (Grattepanche *et al.*, 2008). Un altro effetto positivo delle colture protettive è dato dalla soppressione di alcuni particolari ceppi di *Lc. lactis* che sono talvolta causa di aromi indesiderati (Stanley, 1998). La produzione di composti inibitori e batteriocine può tuttavia essere problematica per l'impiego nella produzione di formaggio, poiché i ceppi produttori di batteriocine inclusi nello starter possono inibire gli stessi starter o comunque portare ad uno squilibrio della composizione dello starter. Ad esempio, *Lb. casei* e *Lb. rhamnosus* producendo acetato, formiato e piccole quantità di diacetile dal metabolismo del citrato, interferiscono negativamente con la crescita di *Propionibacterium freudenreichii* nella produzione di formaggio svizzero a fermentazione propionica (Chamba e Irlinger, 2004). L'isolamento e la selezione di ceppi competitivi produttori di batteriocine a partire da ambienti caseari e la messa a punto di uno starter caratterizzato da una ridotta sensibilità alle batteriocine, sono prerequisiti fondamentali per un corretto impiego di questi ceppi, quali colture protettive, su larga scala.

4. L'antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza rappresenta una sfida globale dal forte impatto sull'utilizzo di tutti gli antibiotici attualmente in commercio. L'origine dei codificanti genetici associati a questo fenomeno è importante al fine di comprendere l'evoluzione e la diffusione dell'antibiotico-resistenza, soprattutto nei microrganismi patogeni. Un'imponente mole di dati bibliografici ci dimostra che i microrganismi ambientali rappresentano la riserva dei geni di resistenza, tuttavia l'utilizzo degli antibiotici da parte dell'uomo ha svolto un ruolo cruciale nella diffusione delle resistenze stesse.

In uno studio di Bhullar *et al.* (2012) sono stati indagati i resistotipi di microrganismi isolati da una particolare grotta nel New Mexico (Lechuguilla Cave), rimasta isolata per oltre 4 milioni di anni. Alcuni di questi microrganismi sono risultati essere resistenti nei confronti di 14 antibiotici diversi, tra cui anche la daptomicina, un antibiotico lipopeptidico, attivo nei confronti di Gram positivi, di recentissima introduzione (primi anni Novanta). Questo studio mette in evidenza come il fenomeno dell'antibiotico resistenza sia naturale, antico e fortemente radicato nel pangenoma microbico.

L'argomento dell'antibiotico-resistenza si colloca quindi in un contesto di interesse sempre maggiore verso la selezione e lo sviluppo di microrganismi resistenti agli antimicrobici, anche in conseguenza all'uso improprio di tali composti, sia in medicina umana, che in ambito veterinario.

Nello specifico, per quanto riguarda l'allevamento animale, l'uso (e spesso l'abuso) degli antibiotici è stato protratto per oltre 50 anni ed era essenzialmente legato ai vantaggi

economici che questo comportava: minore incidenza di infezioni in allevamento e accrescimenti ponderali migliori. Gli antibiotici, quindi, sono stati largamente impiegati non solo a scopi profilattici e terapeutici, ma anche come promotori della crescita (auxinici), ponendo le basi per lo sviluppo di un ambiente idoneo alla selezione degli individui più resistenti.

L'abuso degli antimicrobici in medicina umana e veterinaria è noto, anche se nel caso di molte nazioni non sono disponibili documenti dettagliati in proposito. Analizzando alcune cifre rese note dalle varie autorità nazionali ed internazionali, l'entità del problema diventa più chiara: nel mondo sono consumati da 90 a 180 milioni di chilogrammi di antibiotici l'anno, quantità sufficiente per 25 miliardi di cicli completi di trattamento, 4 l'anno per ogni essere umano; in zootecnia è usata una quantità di antibiotici pari a 10 volte quella impiegata per le infezioni umane. Riportando alcuni esempi, secondo un rapporto del Ministero dell'Agricoltura francese, nel 98% dei casi i mangimi destinati all'alimentazione dei suini conterrebbero antibiotici; la quantità aggiunta ogni anno ai mangimi in Olanda ammonterebbe a circa 200 tonnellate; negli Stati Uniti 12 tonnellate delle 18 prodotte annualmente verrebbero usate per scopi non terapeutici all'interno degli allevamenti.

Cinquanta anni dopo il primo impiego clinico della penicillina, l'argomento ha finalmente ottenuto la meritata attenzione e la ricerca è rivolta a nuove strategie antibatteriche (Amabile-Cuevas C., 2003).

4.1 Selezione di antibiotico-resistenze

Gli antibiotici sono composti che uccidono le cellule batteriche o ne inibiscono la crescita, senza danneggiare le cellule dell'ospite e che, quindi, agiscono in virtù di una tossicità selettiva. Possono essere classificati in diversi modi, ad esempio, in base alla struttura chimica, al meccanismo d'azione o all'attività nei confronti di particolari tipi di microrganismi (batteri, funghi, virus).

I batteri vengono detti resistenti se la loro crescita non è arrestata dalla concentrazione massima di un antibiotico tollerata dall'ospite.

La comparsa di ceppi batterici resistenti agli antibiotici è nota fin dall'introduzione della penicillina. I microrganismi in grado di produrre sostanze antibatteriche ne sono un esempio, poiché i meccanismi di antibiotico-resistenza risultano per loro fondamentali per proteggersi dai prodotti del loro stesso metabolismo (Davies, 1997). Tuttavia, negli ultimi anni, il problema ha assunto proporzioni allarmanti, in quanto va ad interessare batteri patogeni e commensali, divenuti resistenti anche verso i farmaci di ultima generazione.

I fattori fondamentali da tenere in considerazione per capire l'evoluzione di ceppi batterici resistenti sono due: l'**esistenza di geni specifici**, codificanti la resistenza e la **pressione selettiva** causata dall'uso massivo di antibiotici, negli ultimi anni.

Per comprendere appieno l'argomento è necessario, inoltre, soffermarsi sulla distinzione tra **resistenza intrinseca** e **resistenza acquisita**.

La prima è peculiare di un genere o di una specie batterica (resistenza naturale) e consiste nella capacità di un microrganismo di sopravvivere e riprodursi anche in presenza di un agente

antimicrobico. E' dovuta a particolari caratteristiche del genere o della specie; nella maggior parte dei casi non è trasferibile orizzontalmente, poiché conferita da geni situati sul cromosoma batterico. Di conseguenza, quando interessa batteri non patogeni (es. lattobacilli, *Leuconostoc* spp, pediococchi naturalmente resistenti alla vancomicina), non costituisce un rischio né per la diffusione dei geni della resistenza, né per la salute umana.

Al contrario, la resistenza acquisita è tipica di alcuni ceppi all'interno di una specie solitamente sensibile all'antibiotico preso in considerazione e può essere diffusa orizzontalmente tra i batteri; perciò è considerata maggiormente pericolosa rispetto alla resistenza intrinseca. Può manifestarsi a seguito di mutazioni casuali a carico del genoma batterico (inserzione, eliminazione o sostituzione di uno o più nucleotidi all'interno del genoma) oppure attraverso l'acquisizione di geni addizionali codificanti meccanismi di resistenza, che alterano e potenziano le naturali funzioni difensive dei batteri, molto spesso legati ad elementi mobili, quali i plasmidi. I meccanismi alla base della resistenza sono gli stessi, sia che questa sia intrinseca o acquisita: modificazioni del bersaglio specifico per un antibiotico, disattivazione enzimatica dell'antibiotico, trasporto attivo della molecola nociva al di fuori della cellula, cambiamenti riguardanti il metabolismo batterico stesso.

L'antibiotico-resistenza può diffondersi, all'interno di una popolazione microbica, come già accennato, in maniera orizzontale oppure verticale.

La diffusione verticale è legata alla riproduzione clonale di un particolare ceppo resistente e riguarda, soprattutto, la resistenza intrinseca; quella orizzontale interessa, invece, la resistenza acquisita e può realizzarsi attraverso diversi meccanismi individuati nei batteri: **trasformazione** (integrazione da parte della cellula di materiale genetico libero all'interno di un mezzo extracellulare); **coniugazione** (trasferimento di materiale genetico, spesso extracromosomiale, ad esempio i **plasmidi**, da una cellula all'altra, che avviene a seguito del contatto cellula-cellula) oppure **trasduzione** (trasferimento di materiale genetico mediato dai batteriofagi) (Davison *et al.*, 1999).

Il fatto che la maggior parte dei geni della resistenza sia stata trovata su elementi mobili, come plasmidi e trasposoni coniugativi, fa pensare che il contributo più importante alla diffusione dell'antibiotico-resistenza sia dato dalla coniugazione stessa: quando uno o più geni della resistenza sono collocati su un plasmide coniugativo, questi possono muoversi da un batterio all'altro grazie al trasferimento del plasmide stesso attraverso un particolare apparato interno (*sex pilus*). Una copia del plasmide rimane sempre nel microrganismo di provenienza. Grazie alla coniugazione il DNA può, inoltre, muoversi attraverso i diversi generi e specie batteriche. La trasformazione e la trasduzione riguardano, invece, nella maggior parte dei casi, microrganismi appartenenti alla stessa specie.

Esistono, comunque, altri meccanismi che influenzano la probabilità di trasferimento di materiale genetico, legati sia al cromosoma batterico, che ai plasmidi. I **trasposoni**, per esempio, possono albergare al loro interno geni della resistenza; non sono in grado di replicarsi da soli, tuttavia si affidano ai meccanismi di replicazione del cromosoma o dei plasmidi. Riescono, quindi, ad aumentare la mobilità di tali geni, poiché sono in grado di trasportarli da

un microrganismo all'altro, attraverso la replicazione di plasmidi o cromosomi stessi. Gli **integroni** sono altri elementi genetici capaci di trasportare geni della resistenza e in particolare sono implicati nella diffusione di resistenze tra i batteri Gram-negativi. Non possono muoversi da soli, ma contengono un particolare gene, il cui prodotto, un'integrasi, riesce a mobilizzare i geni della resistenza, situati sull'integrone stesso, andando così ad incrementare la diffusione orizzontale di tali elementi anche tra batteri filogeneticamente non affini, come già avviene negli altri casi.

In un ambiente caratterizzato dalla massiccia presenza di antibiotici saranno, quindi, favoriti gli individui che recano plasmidi o altri elementi mobili ospitanti geni della resistenza ed è probabile che, sotto la pressione selettiva, sia favorito lo scambio di materiale genetico, con conseguente aumento dei microrganismi resistenti.

In via generale, la resistenza intrinseca e la resistenza acquisita legata a mutazioni cromosomiche presentano un basso rischio di trasmissione orizzontale tra i microrganismi, mentre questo rischio è elevato quando la resistenza acquisita è dovuta a geni addizionali (Normark and Normark, 2002; Levy and Marshall, 2004).

E' importante sottolineare che la presenza di un singolo antibiotico nell'habitat naturale di un microrganismo può favorire la selezione di batteri resistenti non solo nei confronti del farmaco in questione, ma anche verso altri composti: la resistenza alla tetraciclina, data dal gene *tet(M)*, per esempio, comporta anche la resistenza verso composti strutturalmente simili e appartenenti alla stessa classe, come clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e minociclina (Chopra e Roberts, 2001); un fenomeno analogo è osservato anche quando antibiotici appartenenti a classi diverse condividono lo stesso target e questo viene modificato, a seguito dell'acquisizione di un gene della resistenza.

4.2. Antibiotico-resistenza nei batteri lattici: gli alimenti come vettori

I batteri lattici sono tradizionalmente usati per la produzione di un'ampia varietà di alimenti fermentati, quali formaggi, latti acidi, burro, carni fermentate e affumicate, prodotti da forno e altri ancora. Alcuni dei loro metaboliti più importanti sono, oltre all'acido lattico, acetaldeide, responsabile del tipico sapore dello yogurt, acido formico e acqua ossigenata. Attualmente non sono conosciute specie in grado di produrre antibiotici, anche se è comune la produzione di batteriocine, particolari proteine attive contro batteri Gram-positivi.

Dal punto di vista dei fabbisogni nutritivi, i batteri lattici sono microrganismi molto esigenti. Per una buona crescita necessitano, infatti, di grandi quantità di zuccheri fermentescibili. Conseguentemente, rientrano nel loro habitat naturale anche bocca, intestino, tratto urogenitale di uomini e animali, latte e materia vegetale in decomposizione.

Le specie comunemente impiegate nelle produzioni casearie e in industrie alimentari sono, raramente, causa di infezioni opportunistiche.

Problema di grande importanza e motivo di preoccupazione per ricercatori e autorità, è, ad oggi, il rapido sviluppo di microrganismi, appartenenti al gruppo dei batteri lattici, resistenti agli

antibiotici, comunemente usati in medicina umana e veterinaria, correlato all'uso di tali composti in zootecnia.

Per molti anni l'interesse nei confronti di questo argomento, si è rivolto essenzialmente a batteri patogeni ed opportunistici. Al contrario, gli studi riguardanti batteri commensali (lattobacilli e lattococchi) o, comunque, solo potenzialmente patogeni (enterococchi), sono da sempre passati in secondo piano, sebbene questi microrganismi rappresentino un importante anello di congiunzione tra microflora intestinale degli animali e dell'uomo. Ogni volta che una coltura microbica viene, infatti, impiegata in un processo tecnologico volto ad ottenere un prodotto destinato al consumo alimentare o comunque colonizza naturalmente un prodotto, durante il processo di maturazione, trova una strada veloce e diretta che le permette di arrivare fino al consumatore finale, molto spesso, ancora viva e vitale.

Il ruolo di tali microrganismi nella diffusione dell'antibiotico-resistenza è, quindi, fondamentale. Lo diventa ancora di più, quando consideriamo la microflora non-starter, quella, cioè, che deriva da vari inquinamenti ambientali (animali, sale di mungitura, produzione, stagionatura etc.), ma che, non patogena ed estremamente ricca, è essenziale per conferire al prodotto finito particolari caratteristiche organolettiche. La microflora non starter, infatti, è strettamente legata all'ambiente di provenienza, risente per prima dei cambiamenti riguardanti tale ambiente ed è soggetta alla sola selezione naturale. L'impiego di tali microrganismi, quindi, non può essere controllato e standardizzato, come già avviene per le colture starter.

Studi recenti hanno dimostrato che molti dei batteri commensali possono costituire una riserva di geni codificanti l'antibiotico-resistenza. Suddetti geni sarebbero, inoltre, simili a quelli riscontrati nei patogeni umani (Perreten *et al*, 1997; Levy e Salyers, 2002).

I prodotti caseari fermentati, le carni fermentate o crude non trattate con il calore prima del consumo, possono, così, rappresentare un rischio per la salute del consumatore, poiché costituiscono un legame diretto tra la microflora indigena dell'animale e il tratto gastrointestinale dell'uomo. Quando batteri oramai resistenti ai più comuni antimicrobici, selezionati a seguito di forti cambiamenti del loro habitat naturale, entrano in contatto con quelli intestinali umani, vanno ad interagire con questi ultimi e possono facilmente trasmettere loro forme di antibiotico-resistenza acquisita, secondo i meccanismi di scambio di materiale genetico in precedenza descritti. Il rischio maggiore per il consumatore finale è rappresentato dal potenziale passaggio di antibiotico-resistenze da batteri commensali a patogeni, che spesso albergano nell'intestino umano, attraverso il consumo di alimenti contenenti alte concentrazioni di microrganismi, volutamente aggiunti (starter, probiotici), derivanti dall'ambiente di produzione o dai naturali processi di maturazione del prodotto e non sottoposti ad adeguati criteri di selezione che prevedono l'accertamento dell'assenza di antibiotico-resistenze acquisite.

Molte ricerche ormai confermano la presenza di resistenze in microrganismi, come i batteri lattici, isolati da prodotti alimentari fermentati, anche se spesso queste sono da attribuire a caratteristiche naturali delle specie prese in considerazione e, quindi, non rappresentato un rischio per la diffusione di geni della resistenza. Conoscere la resistenza intrinseca dei

microrganismi nei confronti dei più comuni antimicrobici è, comunque, fondamentale per saper riconoscere i caratteri della resistenza acquisita.

I profili di antibiotico-resistenza di *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Propionibacterium* sono abbastanza diversi. Molte specie sono resistenti a metronidazolo (MIC \geq 32 μ g/ml) (Danielsen and Wind, 2003; Delgado *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 2005), poiché non presentano attività deidrogenasica (target dell'antibiotico). Solitamente sono tutte intrinsecamente resistenti ai sulfonamidi (MIC \geq 256 mg/ml) e al trimetoprim (MICs \geq 30 μ g/ml) (Charteris *et al.*, 1998; Katla *et al.*, 2001), poiché possiedono limitate capacità biosintetiche e non sono in grado di sintetizzare l'acido folico. Tuttavia i LAB sono sensibili alla piperacillina e all'associazione piperacillina/tazobactam (MIC \leq 16 μ g/ml) (Delgado *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 2005; Moubareck *et al.*, 2005). Le specie appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* mostrano elevati livelli di resistenza nei confronti di cefoxitina (MIC \geq 30 μ g/ml) (Charteris *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 2005), molti ceppi sono inoltre resistenti ad elevate concentrazioni di vancomicina (MIC \geq 256 μ g/ml), mentre i lattococchi sono generalmente sensibili nei confronti di quest'ultimo (MIC \leq 2 μ g/ml) (Danielsen and Wind, 2003; Delgado *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 2005). La resistenza di *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* nei confronti di vancomicina sembra essere dovuta alla presenza del D-Ala-D-Lattato, anziché del D-Ala-DAla dipeptide, a livello del peptidoglicano (Billot-Klein *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 2000). Questa resistenza è quindi intrinseca poiché il target dell'antibiotico è assente e non è comparabile con la resistenza alla vancomicina manifestata dagli enterococchi, codificata invece da geni plasmidici (DeLisle e Perl, 2003). Questa naturale resistenza può quindi anche essere utile per distinguere alcune specie di LAB dalle altre (Hamilton-Miller e Shah, 1998; Simpson *et al.*, 1988). All'interno del genere *Lactobacillus* inoltre, non sembrano essere rare mutazioni spontanee, causa di una potenziata resistenza nei confronti di nitrofurazone, kanamicina e streptomina (Curragh e Collins, 1992).

La resistenza alla vancomicina comunque rappresenta oggi una delle maggiori preoccupazioni in ambito scientifico, poiché questo antibiotico è l'unico ancora attivo contro nei confronti di microrganismi multi-resistenti, quali *Staphylococcus aureus* (Pfeltz and Wilkinson, 2004). Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti alle cefalosporine, a basse concentrazioni di aminoglicosidi e clindamicina (Teuber *et al.*, 1999; Knudtson e Hartman, 1993).

La presenza di geni codificanti la resistenza è oramai una certezza in molte specie di LAB. Le omologie delle sequenze nucleotidiche di questi determinanti con quelle precedentemente descritte in altri gruppi batterici suggeriscono che la resistenza si sia prima sviluppata in microrganismi diversi dai LAB, nei quali è stata in qualche modo trasferita successivamente.

L'identificazione a livello di specie diventa, perciò, indispensabile ai fini di un'adeguata interpretazione di dati derivanti da test fenotipici, spesso suscettibili di variazioni rilevanti. Procedendo in quest'ottica saranno disponibili valori di riferimento sempre più precisi, che permetteranno una selezione preliminare entro i ceppi oggetto di studio, al fine di poter riconoscere i microrganismi naturalmente resistenti e proseguire con indagini più approfondite

relativamente ai ceppi potenziali veicoli di geni della resistenza, senza perdite di tempo e risorse.

Sebbene i dati bibliografici offrano maggiori informazioni sulla resistenza naturale dei microrganismi commensali nei confronti degli antimicrobici, negli ultimi anni le ricerche si sono indirizzate verso lo studio della resistenza acquisita e non tardano a farsi strada articoli e documenti sempre più dettagliati a proposito di tale argomento. I vari programmi di monitoraggio, lanciati in tutto il mondo, hanno permesso di aggiornare le conoscenze sui diversi geni della resistenza, sui meccanismi di scambio di materiale genetico e sulle dinamiche di diffusione della resistenza attraverso l'intera catena alimentare. In proposito, esistono già molte nuove informazioni relative ai batteri lattici impiegati nelle industrie alimentari, sulla diffusione orizzontale di antibiotico-resistenze tra generi e specie di maggiore interesse e sulle cause che ne hanno portato allo sviluppo nel tempo (Ammor *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2005).

Alcuni tra i geni più spesso individuati in batteri lattici fenotipicamente resistenti sono quelli che determinano la resistenza nei confronti di tetraciclina (*tetM*; *tetW*, *tetL*, *tetS*, *tetO*, *tet36*); dei macrolidi (*ermB*, *ermT*), di cloramfenicolo (*cat*), degli aminoglicosidi (*aaa(60)Ie-aph(200)Ia*), di streptomina (*str*), situati nella maggior parte dei casi su plasmidi o trasposoni coniugativi (Ammor *et al.*, 2007).

Ad esempio, è stata evidenziata nei batteri lattici la presenza dei geni *tet(M)*, *erm(B)* e *cat* responsabili della resistenza a tetraciclina, eritromicina e cloramfenicolo rispettivamente, con sequenze identiche a quelle riscontrate in microrganismi patogeni (streptococchi), potenzialmente patogeni (enterococchi). Ciò dimostra l'effettiva assenza di barriere tra i diversi gruppi batteri lattici, alcuni dei quali impiegati anche nelle industrie alimentari e la facilità con cui il materiale genetico può essere scambiato tra gruppi di microrganismi filogeneticamente distinti (Teuber *et al.*, 1999).

Molte ricerche hanno dimostrato, attraverso tecniche di biologia molecolare, come ceppi di lattobacilli diversi, sia dal punto di vista tassonomico, che genotipico, isolati da diverse matrici carnee fermentate, potessero essere tutti portatori di geni *tet* situati su plasmidi, molto simili a quelli già riscontrati in alcuni microrganismi patogeni umani, quali *Staphylococcus aureus* e *Neisseria meningitidis* (Gevers *et al.*, 2003).

Altri recenti studi hanno portato al sequenziamento del plasmide, *pMD5057*, responsabile della resistenza alla tetraciclina di un ceppo di *Lb. plantarum*. Tale regione, contenente il gene *tet(M)*, sarebbe, inoltre, caratterizzata da un'elevata omologia con sequenze in precedenza osservate in *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (Danielsen, 2002)

Ricerche condotte sempre negli ultimi anni hanno rilevato la gran diffusione di geni, quali *erm(B)* e *tet(M)*, da soli o associati, in lattobacilli di origine umana e casearia, in Turchia. I ceppi resistenti isolati, un totale di 303, sono risultati per lo più di origine umana (254), mentre quelli di origine casearia si sono rivelati in minor numero (49) e provenienti da formaggi prodotti in piccole aziende. È facile comprendere come, in questo caso, il ruolo chiave per la diffusione dell'antibiotico-resistenza sia giocato dalle inadeguate condizioni igienico-sanitarie di operai e ambienti di produzione. I geni di resistenza sembrerebbero passare, infatti, dai lattobacilli

presenti nell'intestino umano e animale ai prodotti caseari attraverso le contaminazioni fecali che spesso possono verificarsi durante i processi produttivi. L'assenza dei geni *erm(B)* e *tet(M)* nei lattobacilli appartenenti alla microflora starter di prodotti caseari di origine industriale dà modo di pensare che, in ogni caso, prodotti standardizzati e legati alla grande distribuzione, non rappresentino un pericolo per la salute del consumatore (Çataloluk e Gogebakan, 2004).

Come si può notare, l'importanza delle nuove tecnologie legate alla biologia molecolare sta aumentando e aumenta di pari passo il numero dei geni della resistenza ormai sequenziati.

I soli test fenotipici, effettuati sui microrganismi oggetto di studio, non sono più in grado di garantire l'assenza di resistenze acquisite e, nella maggior parte dei casi, non permettono la distinzione dalla resistenza intrinseca. I geni della resistenza, infatti, spesso non sono completamente espressi in un particolare ceppo e, in altri casi, un determinato gene può essere espresso pienamente in tutti i ceppi appartenenti ad una specie. In questo modo è facile cadere in errori di valutazione, causati dalla frequente ambiguità di tali dati. Nonostante ciò, la caratterizzazione fenotipica rappresenta il punto chiave per lo studio dell'espressione della resistenza e per la valutazione della sicurezza di un microrganismo non è mai possibile prescindere dai dati fenotipici. La valutazione della resistenza fenotipica è tuttavia tutt'altro che semplice. I fattori che vanno ad influenzare tali test sono infatti molteplici: entità dell'inoculo, tempi di incubazione (Egervärn *et al.*, 2007), differenti protocolli, tra cui quelli che prevedono l'impiego di terreni colturali liquidi (microdiluizioni) (Kushiro *et al.*, 2009), oppure agarizzati, quali Etest (Danielsen and Wind, 2003), diluizioni su agar (Florez *et al.*, 2005) e metodo di Kirby-Bauer (Gevers *et al.*, 2000). In più attualmente per i vari test vengono utilizzati diversi terreni colturali, con diverse formulazioni, quali Iso-Sensitest, MRS, M17 e Müller-Hinton (Huys *et al.* 2002, Hummel *et al.*, 2007).

Sappiamo che i batteri lattici, come tutti gli altri microrganismi, sono propensi allo scambio di geni. Questo naturale "rimescolamento" viene amplificato in maniera notevole, quando la pressione selettiva è forte e favorisce caratteristiche particolari di alcuni ceppi entro le specie.

Per i microbiologi è, senza dubbio, necessario evitare la distribuzione di microrganismi portatori di resistenze acquisite mobilizzabili. Purtroppo, però, in molti casi, tale distribuzione è, in parte, già avvenuta.

Le misure preventive che devono essere prese in questo senso riguardano essenzialmente l'uso di appropriate colture starter e substrati per le fermentazioni riguardanti gli alimenti. Il trasferimento di antibiotico-resistenze, dagli animali ai prodotti fermentati e conseguentemente all'uomo, può essere, per esempio, evitato con la pastorizzazione di latte crudo e carne o impiegando adeguatamente il calore, prima di qualsiasi utilizzo di tali substrati. Sappiamo però che accorgimenti del genere, seppur efficaci, portano a scadimento qualitativo della materia prima, non solo sotto il profilo nutrizionale, ma anche sotto quello organolettico. La situazione si fa ancor più delicata in paesi come l'Italia, in cui gran parte dei prodotti caseari e carnei, tradizionali e non, è ottenuta proprio a partire da carne o latte crudo, caratterizzati da una microflora molto varia, derivante dall'animale o dall'ambiente di produzione, necessaria al processo di maturazione del prodotto e che si ritrova ancora vitale alla fine di tale processo.

Senza dubbio, devono poter essere percorse altre vie per risolvere il problema della diffusione delle antibiotico-resistenze, pena la perdita di gran parte del nostro patrimonio alimentare.

4.3. Aspetti normativi

Il problema della diffusione delle antibiotico-resistenze da alimenti fermentati, caseari e carnei all'uomo è complesso e passa inevitabilmente attraverso le scelte economico-politiche adottate a livello comunitario riguardanti l'allevamento degli animali da reddito. Per cercare di ridurre gli effetti, le Autorità hanno introdotto, negli ultimi anni, sia a livello nazionale, che comunitario, nuove norme, riguardanti non solo l'impiego di antibiotici in zootecnia, ma anche le caratteristiche che gli stessi microrganismi devono avere per poter essere impiegati nelle industrie alimentari (colture starter, probiotici) e negli allevamenti come additivi per i mangimi. I dati sull'utilizzo degli antimicrobici in Europa, purtroppo, sono scarsi e relazioni dettagliate sono disponibili solo per alcuni paesi. A partire dal 1997, l'Unione Europea ha messo al bando alcuni antibiotici usati in zootecnia e, in particolare, ha proibito l'uso, a fini auxinici, di farmaci già impiegati in medicina umana o che potessero, comunque, indurre a resistenze crociate. Dal 2006, il divieto è stato esteso a tutti gli antimicrobici utilizzati come promotori della crescita negli allevamenti (Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22/10/2003). Alcuni Paesi, in particolare, hanno affrontato tempestivamente il problema, grazie a propri programmi di monitoraggio, in grado di controllare la diffusione delle antibiotico-resistenze lungo l'intera catena alimentare. E' il caso di Danimarca con il programma DANMAP, Svezia con SVARM/SWEDRES, Norvegia con NORM/NORM-VET e Olanda con MARAN. Programmi simili esistono in Francia, Spagna e Gran Bretagna. Anche l'Italia con il progetto ARAFOA, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, ha valutato i rischi legati alla presenza di antibiotico-resistenze negli alimenti fermentati di origine animale (carnei e caseari), con particolare riferimento alle produzioni tipiche e a denominazione protetta, correlandola con l'uso dei promotori della crescita in zootecnia.

Attualmente non vi sono normative cogenti relativamente alla tematica dell'antibiotico-resistenza in microrganismi utilizzati in processi alimentari, anche se l'attenzione verso questo argomento da una decina di anni a questa parte è sempre più alta. Nel 2001 la Commissione Scientifica sulla Nutrizione Animale della Comunità Europea (SCAN) è stata chiamata a documentare i criteri di valutazione della sicurezza di microrganismi utilizzati come *feed additives* per quanto riguardava la resistenza ad antibiotici di rilevante importanza in medicina umana e medicina veterinaria (*Opinion Of The Scientific Committee On Animal Nutrition On The Criteria For Assessing The Safety Of Micro-Organisms Resistant To Antibiotics Of Human Clinical And Veterinary Importance*, 2001). Dopo l'adozione del primo documento emanato dalla SCAN, l'attenzione sul tema dell'antibiotico-resistenza è andata crescendo e si è spostata anche verso quei microrganismi commensali, quali i batteri lattici e gli enterococchi, tanto utilizzati dalle industrie alimentari e mangimistiche. In pochi anni, sono stati scoperti nuovi determinanti genetici ed elementi mobili legati ai meccanismi di resistenza in tali microrganismi e in breve tempo, si sono aperte innumerevoli strade per lo studio delle basi genetiche della resistenza

stessa. Già nel 2003, alla luce delle nuove acquisizioni scientifiche, il documento della SCAN è stato formalmente rivisto. La necessità di un più approfondito e completo aggiornamento dell'intera *Opinion* ha portato all'emanazione di un nuovo documento da parte dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Il gruppo *Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed* (FEEDAP) è stato chiamato dalla Commissione Europea a rivedere l'intero documento della SCAN, con lo scopo di stabilire, quando necessario, nuovi valori di *cut off* utili ad individuare, sulla base di test fenotipici standardizzati, i potenziali portatori di resistenze mobilizzabili, candidati ad ulteriori indagini genotipiche. Oggetto di revisione è stata, inoltre, la validità della distinzione tra resistenza intrinseca e acquisita, usata come indice di probabilità di trasferimento di resistenza tra i microrganismi, e, quindi, anche come indice di sicurezza dei microrganismi stessi impiegati nell'industria mangimistica. Il documento FEEDAP è stato successivamente rivisto due volte (2005, 2008) fino ad arrivare alla versione più recente, emanata nel giugno 2012 (*Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)*; EFSA Journal 2012).

Quest'ultimo documento fornisce aggiornamenti in merito ai criteri utilizzati per la distinzione tra batteri resistenti e sensibili ai più comuni antibiotici utilizzati in medicina umana e medicina veterinaria. Secondo il documento EFSA, un prerequisito fondamentale per procedere nell'accertamento della sicurezza di un microrganismo, è, innanzitutto, la corretta identificazione del ceppo a livello di specie, per mezzo di tecniche di tassonomia molecolare. Solo a questo punto può essere determinato il valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.), relativo all'antibiotico scelto nei confronti del ceppo oggetto di studio. La M.I.C. è definita come la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica espressa in ppm ($\mu\text{g/ml}$, mg/l). I test effettuati per stabilire la M.I.C. devono essere in accordo con procedure standardizzate, quali quelle stabilite dal CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), standard ISO o similari. Uno standard ISO è attualmente disponibile per i bifidobatteri e batteri lattici diversi da enterococchi (ISO 10932:2010 (IDF 223:2010)). I valori di M.I.C., ottenuti dopo incubazione, saranno poi confrontati con i valori microbiologici di *cut off* stabiliti dal FEEDAP. Questi sono fissati in base alla distribuzione delle M.I.C. relative ai diversi antimicrobici, in popolazioni batteriche appartenenti ad una singola unità tassonomica (genere o specie), considerando sempre le diverse ricerche e studi già esistenti in proposito, tra cui quelli che derivano dai diversi programmi di monitoraggio, nazionali ed europei. I dati utilizzati per stabilire i *cut off* microbiologici derivano anch'essi da dati disponibili in bibliografia, da dati emanati dalla Commissione Europea sui Test di Suscettibilità Antimicrobica (EUCAST, <http://www.eucast.org/>) e dai programmi di monitoraggio nazionali e europei.

Utilizzando i valori di *cut off* possono essere distinti i ceppi resistenti da quelli suscettibili: la parte di popolazione batterica che chiaramente si distacca da quella normalmente suscettibile viene definita resistente, dove per resistente si intende un ceppo batterico la cui crescita non è inibita al punto di *cut off*, relativo ad uno specifico antimicrobico, in un test fenotipico ben definito ($R > x \text{ mg/l}$). Al contrario, un ceppo è definito suscettibile, quando la sua crescita è

inibita al punto di *cut off*, relativo ad un particolare antibiotico, in un test fenotipico ben definito ($S \leq x$ mg/l).

I valori di *cut off* sono utilizzati quindi anche al fine di individuare ceppi potenziali portatori di resistenze acquisite. Per questo motivo però, non devono essere considerati come definitivi o usati per squalificare automaticamente un microrganismo dell'uso come additivo alimentare. Il *cut off* microbiologico rappresenta, piuttosto, un particolare valore di minima concentrazione inibente, che se superato rivela la necessità di una più approfondita ricerca in merito alla base genetica della resistenza osservata. Tale resistenza deve essere, infatti, definita con certezza come intrinseca o acquisita. La prima, come accennato in precedenza, è caratteristica di una specie o genere e si osserva quando tutti i ceppi appartenenti ad una particolare unità tassonomica risultano fenotipicamente resistenti all'antibiotico scelto per il test. Se non esistono dati in bibliografia, riguardo alla natura intrinseca della resistenza del gruppo batterico specifico verso l'antibiotico oggetto di studio, la natura strutturale e la base genetica di tale resistenza intrinseca devono essere necessariamente dimostrate, analizzando un numero rappresentativo di ceppi appartenenti all'unità tassonomica di interesse. Una volta appurata la natura intrinseca della resistenza e la mancata associazione dei geni responsabili di tale caratteristica ad elementi mobili, il rischio legato al trasferimento di resistenze è considerato minimo. Nel caso specifico, i microrganismi sono considerati accettabili per l'uso in industrie alimentari o mangimistiche, quali additivi o altro.

Quando un ceppo batterico, al contrario, dimostra una resistenza particolarmente elevata nei confronti di un componente antimicrobico, rispetto ad altri ceppi appartenenti alla stessa unità tassonomica e naturalmente suscettibili al farmaco considerato, questa può essere causata da una resistenza acquisita ed è necessario proseguire con ulteriori indagini molecolari.

La resistenza acquisita può essere, infatti, dovuta a diversi fattori ed, in particolare, il rischio di trasferimento tra i microrganismi varia notevolmente a seconda che si considerino mutazioni cromosomiche o geni acquisiti attraverso l'integrazione di DNA esogeno. La resistenza dovuta a mutazioni genetiche presenta, infatti, un basso rischio di diffusione orizzontale ed è considerata generalmente accettabile dal Panel FEEDAP, poiché non è quasi mai legata ad elementi mobili. Quando, invece, ci troviamo di fronte a geni additivi legati ad elementi mobili, non c'è dubbio che il ceppo in questione non possa essere accettato come coadiuvante tecnologico.

I punti chiave del documento EFSA sono riportati nello schema esemplificativo che segue (Figura 7).

Un altro importante documento proposto dalla Commissione Europea, in particolare da membri della *Scientific Committee on Animal Nutrition, Scientific Committee on Food e Scientific Committee on Plants*, si è occupato della sicurezza di microrganismi usati per la produzione di alimenti fermentati (*On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production*, 2003), valutando la possibilità di sottoporre tali microrganismi ad un sistema di controllo che ne garantisca la sicurezza (*case-by-case safety assessment*). Sulla base di questo documento, un microrganismo che riceve la "*Qualified presumption of safety*" (QPS), deve possedere ben determinati requisiti. Nello stesso

documento sono, inoltre, riportati alcuni esempi significativi di come questo sistema deve essere applicato; nel caso dei "*dairy lactobacilli*", la sola specifica richiesta è proprio l'assenza di antibiotico-resistenze acquisite verso i più importanti antimicrobici usati in medicina umana e veterinaria.

E' di fondamentale importanza, quindi, stabilire, sia a livello comunitario che mondiale, criteri, standard, linee-guida a tutela del consumatore; al tempo stesso sono necessarie adeguate metodologie standardizzate, per poter verificare la sicurezza dei microrganismi che si intende impiegare nelle industrie alimentari, prima del loro utilizzo e per assicurare il permanere delle caratteristiche che li rendono sicuri, anche dopo il loro impiego. Prevenzione e monitoraggio diventano, quindi, il fondamento di questo nuovo approccio ai microrganismi commensali, che grazie alle loro proprietà rendono vario e ampio il panorama dei nostri prodotti alimentari, dai più tradizionali a quelli industriali, ma che non per questo devono essere considerati innocui a priori.

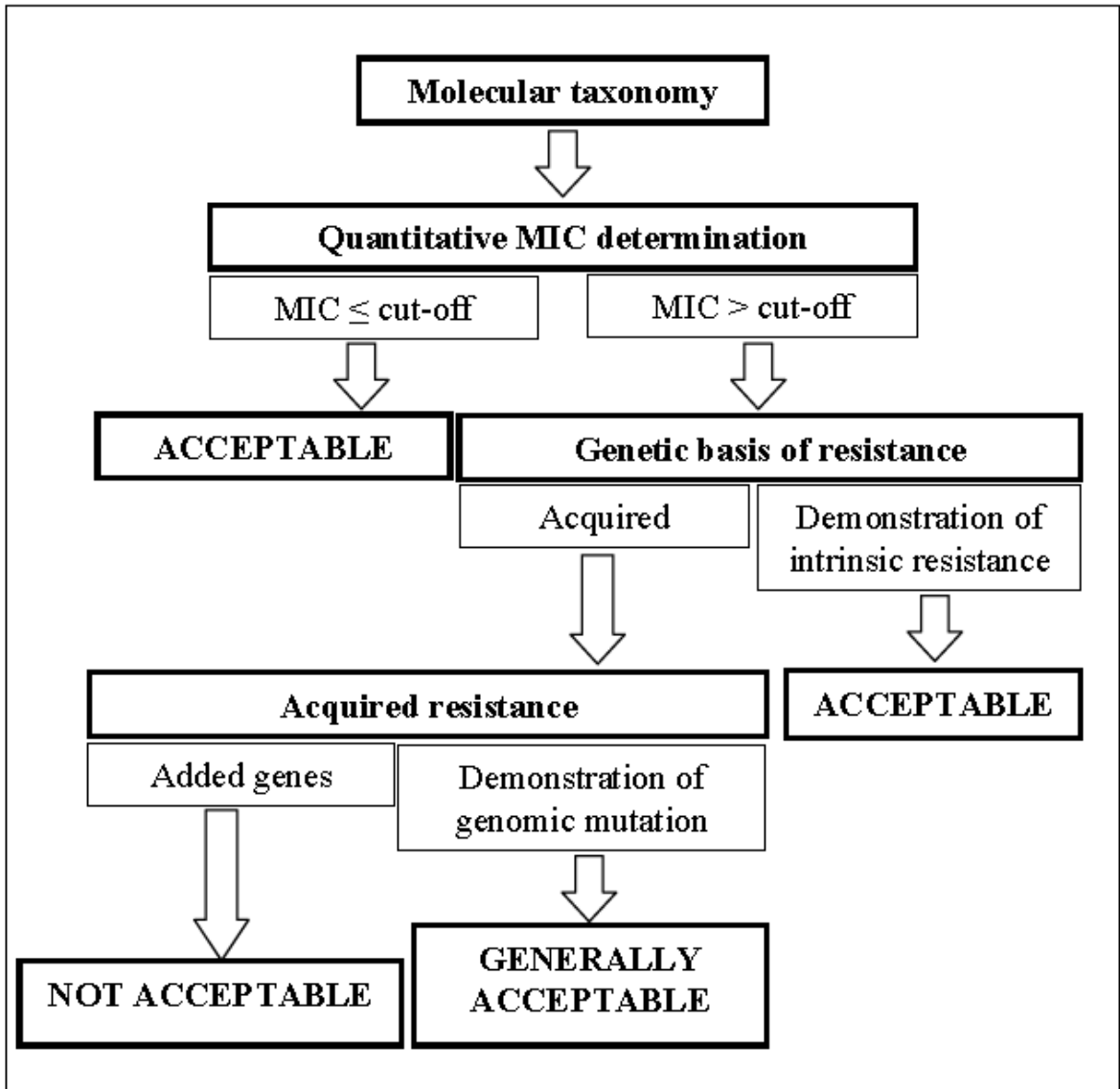


Fig.7: Schema proposto per la valutazione dell'antibiotico-resistenza di ceppi batterici utilizzati per le produzioni alimentari.

5. Caratterizzazione tecnologica dei batteri lattici

Al fine di un impiego razionale in tecnologia dei batteri lattici è necessario approfondire la conoscenza dei vari caratteri fenotipici che li contraddistinguono. In questo senso sono ancora molto utili i tradizionali sistemi di classificazione, basati sui criteri proposti da Orla-Jensen.

I principali fenotipi valutati per comprendere la possibilità o meno di impiegare un microrganismo in un particolare processo tecnologico sono riportati di seguito (Mucchetti e Neviani, 2006):

- capacità di fermentare lattosio e galattosio o di utilizzare altri substrati carboniosi, come acido citrico o altre frazioni glucidiche legate alla caseina
- possibilità di utilizzare differenti frazioni azotate, quali peptidi e amminoacidi
- resistenza agli stress osmotici
- capacità di crescere nelle condizioni differenziate di temperatura imposte da un determinato processo tecnologico
- capacità di interagire positivamente con altri microrganismi o di inibirli
- attitudine alla proteolisi
- sensibilità all'infezione fagica
- attitudine all'autolisi
- capacità di produrre polisaccaridi esocellulari

Lo sviluppo di diverse tecniche di studio fenotipiche e genotipiche ha permesso di mettere in evidenza la presenza di più biotipi nell'ambito della stessa specie di interesse lattiero-caseario. Ceppi della stessa specie possono avere infatti attitudini metaboliche diverse, sia sotto il profilo qualitativo che quantitativo. Questa variabilità è stata spesso associata alla plasticità del genoma delle specie lattiche, in grado di adattarsi a diverse nicchie ecologiche, come è stato evidenziato dalla presenza preferenziale di alcuni biotipi particolari in alcune nicchie casearie. La selezione conseguente alle modificazioni del substrato che si hanno nel corso della trasformazione del latte in formaggio favorisce il fenomeno per cui specie e biotipi diversi possono prevalere in diverse fasi della fermentazione (Gatti *et al.*, 2003; Giraffa *et al.*, 2003; Lombardi *et al.*, 2002).

La presenza nella stessa specie di più biotipi, contraddistinti da attitudini fisiologiche e metaboliche diverse, assume un rilievo di natura tecnologica. E' così infatti possibile utilizzare ceppi con particolari caratteristiche utili alla trasformazione o allestire miscele di biotipi diversi in grado di interagire e cooperare alternandosi nella trasformazione di un substrato. In questo senso la biodiversità fenotipica rappresenta un'opportunità di grande interesse applicativo.

Di seguito sono approfonditi alcuni aspetti di maggiore interesse nell'ambito della presente tesi di dottorato.

5.1 Attività acidificante

I batteri lattici ricavano l'energia indispensabile al loro metabolismo tramite la fermentazione degli zuccheri, che usano come fonte di carbonio. I carboidrati che possono entrare a far parte di questo processo sono diversi e l'attitudine a fermentare i monosaccaridi piuttosto che i disaccaridi varia in relazione alle caratteristiche fisiologiche del biotipo e alle condizioni ambientali. L'economia cellulare impone che l'impiego delle differenti forme di carboidrati, se in miscela, sia rigorosamente

controllato in modo gerarchico. Quando il microrganismo dispone di varie fonti di carbonio "sceglie" la via metabolica di maggior profitto energetico per la crescita. E' stato osservato che in molte specie il consumo del galattosio può essere condizionato dal preliminare esaurimento di glucosio e lattosio nel mezzo ed è comunque sempre meno rapido di quello del lattosio (Poolman, 2002; Tigermeier e Hillen, 2002; Axelsson, 1993). La fermentazione lattica avviene, per i batteri mesofili, ad una temperatura compresa tra 20°C e 30°C, per i termofili, invece, tra 37°C e 47°C ed è di fondamentale importanza nella produzione dei lattici fermentati e dei formaggi (Bottazzi, 1993). Ogni fattore in grado di causare inibizione o rallentamento della fermentazione lattica può pregiudicare la buona riuscita del prodotto finito, perciò è importante conoscere nel dettaglio tutti i processi che regolano il metabolismo dei batteri lattici, al fine di prevenire o eventualmente correggere qualsiasi errore tecnologico (Lodi, 2003). Le capacità fermentative dei batteri lattici variano notevolmente a seconda del genere considerato e con riferimento anche ai singoli ceppi delle medesime specie. Per questo, ogni tipo di produzione vanta una particolare miscela di microrganismi, impiegata al fine di pilotare il processo tecnologico ed in funzione dei risultati che si intende ottenere. Generalmente, si può dire che vengono impiegate specie più acidificanti per la produzione di formaggi a pasta dura ed a lunga stagionatura e specie meno acidificanti nella preparazione di formaggi freschi, molli ed a media stagionatura (Salvadori del Prato, 1998).

La produzione di acido lattico e lattati può variare non solo in termini quantitativi, ma anche qualitativi: l'acido lattico prodotto può presentarsi, infatti, in diversa configurazione ottica, a seconda del tipo di latticodeidrogenasi (LDH) che opera a livello della riduzione dell'acido piruvico. I principali stereoisomeri dell'acido lattico sono D-lattato e L-lattato o una miscela racemica dei due, il DL-lattato. I ceppi produttori di L-lattato (L+) sono preferiti rispetto ai ceppi produttori di D-lattato D(-), in quanto questa forma non è prontamente assorbita da uomo e animali (Bottazzi, 1993).

L'acidificazione del latte, che nel processo di caseificazione avviene nelle prime ore dopo la formazione della cagliata, può essere considerata come il punto di partenza per la maturazione del formaggio: l'abbassamento del pH contribuisce non solo alla rimozione del calcio dalla paracaseina, ma anche alla destabilizzazione del complesso fosfato calcico, influenzando al tempo stesso la sineresi, la proteolisi e le caratteristiche strutturali del prodotto finito (Salvadori del Prato, 1998).

Un'acidificazione rapida e ben controllata permette, inoltre, di inibire le numerose flore patogene ed anticasearie, responsabili di difetti di struttura e sapore dei prodotti finiti.

I batteri lattici possono seguire due diverse vie fermentative di metabolizzazione del lattosio, che si differenziano per i prodotti finali ottenuti: la via omolattica e la via eterolattica. In ogni caso, al termine di entrambi i processi si ha acidificazione del mezzo e conseguente abbassamento del pH; nella fermentazione eterolattica, però, oltre all'acido lattico, si ha sviluppo anche di altri metaboliti di fondamentale importanza per le caratteristiche organolettiche del prodotto finito (Salvadori del Prato, 1998).

Con la fermentazione omolattica, da una molecola di un monosaccaride, come il glucosio, i batteri lattici ottengono una resa teorica di due molecole di acido piruvico, che in condizioni normali, cioè in presenza di zuccheri e limitata disponibilità di ossigeno, vengono ridotte ad acido lattico. Affinché questo sia possibile, i batteri lattici devono prima idrolizzare il lattosio, unico zucchero presente nel latte, nei suoi monomeri, glucosio e galattosio. Le vie che riguardano il sistema di trasporto del lattosio nella cellula batterica sono due, per cui sono diversi anche gli enzimi che operano l'idrolisi del lattosio stesso.

Una prima via prevede la fosforilazione del lattosio a livello della parete cellulare attraverso il sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasi (PEP-PTS), con formazione di lattosio-6-fosfato; nel secondo caso, invece, il lattosio entra nella cellula senza subire modificazioni attraverso una permeasi presente sulla parete cellulare (Bottazzi, 1993).

Successivamente, sul lattosio-6-fosfato interviene la β -fosfo-galattosidasi (P- β -Gal), che ne opera l'idrolisi, con formazione di una molecola di galattosio-6-fosfato e una di glucosio; mentre sul lattosio della seconda via agisce la β -galattosidasi (β -Gal), con formazione di una molecola di glucosio e una di galattosio.

A questo punto, il glucosio seguirà la via glicolitica di Embden-Meyerhof-Parnas, il galattosio quella di Leloir e il galattosio-6-fosfato quella del tagatosio-6-fosfato (Bottazzi, 1993) (Figura 8).

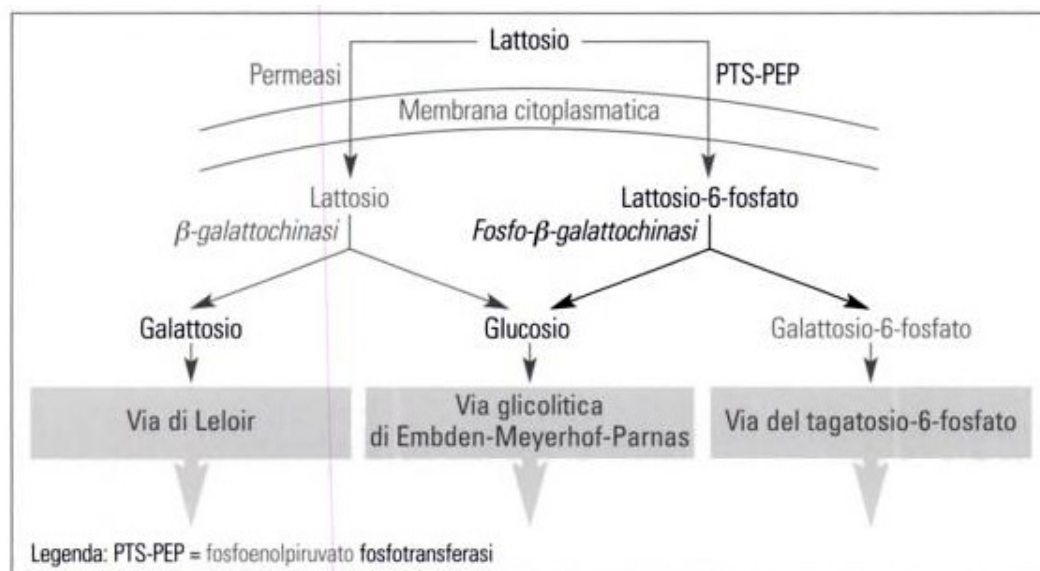


Fig.8: Principali vie di fermentazione omolattica del lattosio da parte di batteri lattici (da Mucchetti e Neviani, 2006)

Le diverse specie omofermentanti di interesse lattiero-caseario hanno ciascuna una propria caratterizzazione metabolica: le specie appartenenti al genere *Lactococcus*, ad esempio, assumono lattosio attraverso il sistema PTS-PEP e gli enzimi che intervengono nell'idrolisi possono essere sia la P- β -Gal, che la β -Gal; per quanto riguarda *Streptococcus*, l'entrata del lattosio nella cellula avviene attraverso la permeasi, mentre l'idrolisi è operata dalla β -Gal; lo stesso avviene per le specie omofermentanti appartenenti al genere *Lactobacillus* (Bottazzi, 1993).

E' importante ricordare il particolare comportamento di alcune specie, quali *Str. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, nei confronti del galattosio: queste specie, infatti, in caso di eccesso di lattosio nel substrato di sviluppo, non sono in grado di metabolizzare il galattosio, per mancanza della via di Leloir. In conseguenza di ciò, durante la crescita batterica, questo monosaccaride si accumula nel substrato di partenza in concentrazione equimolare rispetto al lattosio utilizzato. Questa particolarità è diventata successivamente caratteristica fondamentale di alcuni prodotti come lo yoghurt, per la cui produzione sono utilizzate proprio le due specie menzionate (Salvadori del Prato, 1998).

Con la fermentazione eterolattica, invece, la via metabolica seguita per l'utilizzazione del lattosio, porta a liberazione di anidride carbonica, acido lattico e acido acetico (o alcool etilico), in rapporto costante di 1:1:1 (Figura 9). Questa via è seguita da alcune specie del genere *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Il lattosio entra nella cellula batterica attraverso una permeasi di membrana e successivamente subisce l'attacco dell'enzima β -galattosidasi, che lo idrolizza in glucosio e galattosio. Il glucosio viene poi fosforilato a glucosio-6-fosfato e ancora ossidato ad acido fosfogluconico, che a sua volta subisce decarbossilazione con formazione di ribosio-5-fosfato e liberazione di anidride carbonica. L'enzima fosfochetolasi, che catalizza la reazione di passaggio da xilulosio-5-fosfato ad aldeide-glicerica-3-fosfato e acetil-fosfato, è caratteristico dei batteri eterofermentanti ed è proprio grazie a questo enzima che gli eterofermentanti sono in grado di fermentare direttamente i pentosi. In questo caso, però, non essendo necessaria la decarbossilazione, non vi è liberazione di anidride carbonica, quale prodotto terminale. L'aldeide glicerica è poi trasformata in acido lattico, seguendo la via glicolitica normale (via acido piruvico), mentre l'acetil-fosfato è prima defosforilato e poi convertito in aldeide acetica, che sarà ulteriormente trasformata in acido acetico o alcool etilico (Bottazzi, 1993).

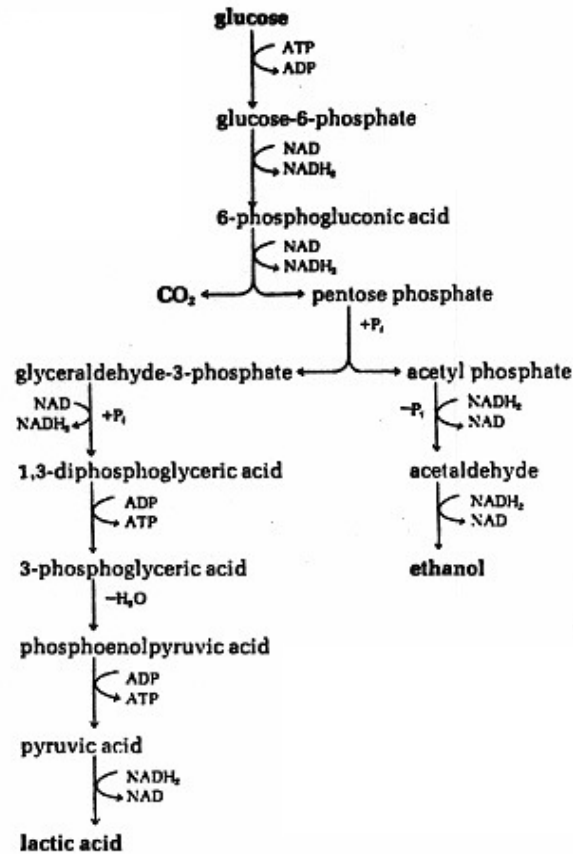


Fig.9: Fermentazione etero lattica del lattosio da parte di batteri lattici (www.larapedia.com)

5.2 Attività proteolitica

I batteri lattici hanno possibilità molto limitate di biosintetizzare amminoacidi, seppur molti di questi, tra cui fenilalanina, tirosina, lisina e alanina, siano essenziali per il loro sviluppo. Tale esigenza nutrizionale è variabile in relazione alla specie e, in taluni casi, è legata a caratteristiche specifiche del singolo ceppo (Mucchetti e Neviani, 2006).

Le proteine del latte, in particolare le caseine organizzate in micelle, hanno dimensioni troppo elevate per poter arrivare nel citoplasma della cellula batterica attraverso la parete e la membrana cellulare; allo stesso tempo, il latte fresco contiene una quantità insufficiente di amminoacidi liberi, urea e peptidi a basso peso molecolare a sostenere la crescita delle microflora casearie. Per questo, affinché possano continuare a moltiplicarsi, i batteri lattici utilizzano sistemi enzimatici idonei all'idrolisi delle caseine ed, eventualmente, delle sieroproteine ad oligopeptidi. Successivamente, a seconda dei diversi generi e specie, le molecole così ottenute sono inglobate all'interno della cellula mediante diversi sistemi di trasporto (Bottazzi, 1993).

In via generale, possiamo dire che i batteri lattici hanno un'azione proteolitica limitata, ad eccezione di alcune specie come *Str. faecalis* subsp. *liquefaciens*, che esplica la propria azione

sulla caseina, con intensità diversa da specie a specie e anche tra ceppi appartenenti alla stessa specie.

L'attacco caseinolitico operato dal sistema enzimatico, come detto in precedenza, porta a liberare amminoacidi e polipeptidi, intaccando profondamente la struttura della micella caseinica. Nella cagliata presamica, inoltre, i batteri lattici non si trovano ad idrolizzare la micella caseinica integra, ma il para-fosfo-caseinato, una proteina che ha già subito un attacco proteolitico e, perciò, più suscettibile agli enzimi specifici della microflora casearia (Salvadori del Prato, 1998).

I composti liberati, tra cui ammoniaca, ammine, aldeidi, fenoli, indolo e alcoli, contribuiscono a dare l'aroma al formaggio e la degradazione, più o meno spinta, del para-fosfo-caseinato ne influenza anche la struttura: rimarrà compatta se la proteolisi è limitata, sarà pastosa e morbida con un grado medio di proteolisi, infine, fluidificherà se la proteolisi è eccessiva (Salvadori del Prato, 1998).

Il catabolismo degli amminoacidi è considerato uno dei metabolismi di maggiore importanza per la formazione del sapore e dell'aroma del formaggio (Tanous *et al.*, 2002; Tavarina *et al.*, 2002).

Lo studio degli enzimi proteinasici e peptidasici sintetizzati dai batteri lattici è estremamente complesso e vario per ogni specie. Questa complessità è ulteriormente ampliata dalla localizzazione cellulare dei sistemi enzimatici stessi: i batteri lattici, infatti, oltre che a secernere piccole quantità di enzimi extracellulari, ne elaborano anche a livello della parete cellulare e in sede intracellulare stessa. Tuttavia, numerose ricerche concordano nel sostenere che le proteinasi responsabili della degradazione delle proteine del latte sono quelle fissate sulla parete cellulare dei batteri (Thomas *et al.*, 1981).

L'utilizzazione delle proteine del latte da parte dei batteri lattici e il funzionamento dei sistemi di trasporto all'interno della cellula batterica possono essere schematicamente così descritti:

- le proteinasi, che rompono le proteine in peptidi
- i sistemi di trasporto, che traslocano i prodotti di degradazione attraverso la membrana citoplasmatica
- le peptidasie, che degradano i peptidi in amminoacidi liberi

La rottura iniziale delle caseine è imputabile ad una singola **proteinasi** extracellulare legata alla parete dei batteri lattici (CEP). Studi di delezione del gene responsabile della produzione di tale proteinasi hanno dimostrato come i ceppi di batteri lattici deleti non possano crescere nel latte in assenza di una CEP funzionante. Questo enzima è una proteinasi appartenente alla famiglia delle subtilisine, di cui ad oggi si riconoscono 5 tipi presenti in diverse specie di batteri lattici: PrtP in *Lc. lactis* e *Lb. paracasei*, PrtH in *Lb. helveticus*, PrtR in *Lb. rhamnosus*, PrtS in *Str. thermophilus* e PrtB in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Ciascuno di questi enzimi viene sintetizzato come pre-pro-proteina, costituita da circa 2000 residui, formati da diversi domini funzionali (Siezen, 1999).

In genere le diverse specie di batteri lattici possiedono un solo tipo di CEP, sebbene in alcuni lattobacilli sia stata segnalata la presenza di due enzimi (Pederson *et al.*, 1999).

Esistono inoltre proteinasi intracellulari coinvolte nelle reti di regolazione e nelle risposte allo stress dei batteri lattici, necessarie per la crescita in diverse condizioni ambientali, che potrebbero altresì svolgere un ruolo durante la maturazione dei prodotti fermentati.

Il secondo passo nella degradazione delle proteine consiste nel trasporto dei di-, tri- ed oligopeptidi all'interno della cellula tramite l'azione di diversi sistemi di captazione dei peptidi stessi. Sono stati descritti tre diversi sistemi di captazione dei peptidi in *Lc. lactis*: DtpT, Opp e Opt.

DtpT è un trasportatore forza motrice protonica dipendente, la cui specificità è limitata ai di- e tripeptidi; questo trasportatore è presente anche in *Lb. helveticus* e *Str. thermophilus* (Kunji *et al.*, 1993). Opp e Opt sono competenti anche per gli oligopeptidi e sono stati riscontrati in diverse specie di batteri lattici quali *Lc. lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus* e *Lb. plantarum* (Detmers *et al.*, 1998).

Una volta trasportati all'interno della cellula batterica, i peptidi vengono degradati attraverso azioni coordinate ad opera di una matrice di **peptidasi** con diverse specificità, ma sovrapposte (Kunji *et al.*, 1996a). Le peptidasi possono essere suddivise in due tipi: le **endopeptidasi**, che idrolizzano i legami dei peptidi interni, e le **esopeptidasi**, che rimuovono gli aminoacidi da un'estremità della catena dei peptidi. Nei batteri lattici la maggior parte delle esopeptidasi sono aminopeptidasi e le loro specificità dipendono dalla lunghezza dei peptidi e dalla natura dei residui aminoacidici (Kunji *et al.*, 1996b).

PepO è stata la prima endopeptidasi caratterizzata nei batteri lattici. Si tratta di una metalloproteasi di 70 kDa monometrica in grado di idrolizzare peptidi contenenti da 5 a 35 residui, incapace però di idrolizzare caseine intatte. L'analisi dei genomi ha dimostrato che tutti i batteri lattici codificano PepO omologhe. *Lc. lactis* codifica invece anche per una seconda endopeptidasi con proprietà simili a PepO, denominata PepO2. L'analisi del genoma di *Lactobacillus helveticus* ha rivelato la presenza di una terza endopeptidasi, la PepO3 (Savijoski *et al.*, 2006).

Le aminopeptidasi riscontrate nei batteri lattici possono essere divise in tre gruppi: aminopeptidasi ad ampia specificità, aminopeptidasi specifiche per aminoacidi acidi o basici, aminopeptidasi specifiche per i residui idrofobici o aromatici. Le aminopeptidasi ad ampia specificità (PepC e PepN) sono state riscontrate nelle specie appartenenti ai generi *Lactococcus*, *Lactobacillus* e in *Str. thermophilus* (Savijoski *et al.*, 2006). Le aminopeptidasi che hanno azione sui residui acidi (PepA), note anche come glutamilaminopeptidasi, sono state identificate nei genomi di *Lc. lactis* e *Str. thermophilus*. Dal momento che i peptidi amari sono principalmente formati da residui idrofobici ed aromatici, una specifica aminopeptidasi per gli aminoacidi aromatici potrebbe avere un ruolo importante nello sviluppo del sapore dei prodotti lattiero-caseari. Un enzima con questa peculiare attività (PepS) è stato identificato in *Pediococcus pentosaceus*, *Str. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. casei* e *Lb. sakei*. PepL è invece

una aminopeptidasi riscontrata solo in *Lb. delbrueckii* e dispone di un'alta specificità per i residui di leucina e alanina (Savijoski *et al.*, 2006).

Diverse dipeptidasi sono state descritte nei batteri lattici sia ad ampia specificità (PepD e PepV) che a specificità più ristretta, nei confronti peptidi contenenti prolina (PepQ e PepR) (Savijoski *et al.*, 2006).

Le tripeptidasi dei batteri lattici sono enzimi caratterizzati dalla capacità di idrolizzare una vasta gamma di tripeptidi con diverse sequenze aminoacidiche, tuttavia non idrolizzano i tripeptidi contenenti prolina in posizione centrale. La tripeptidasi PepT è stata identificata in *Lc. lactis*, *Str. thermophilus* e *Lb. helveticus*. Esistono inoltre peptidasi prolina-specifiche, rappresentate da enzimi quali aminopeptidasi e dipeptidasi (PepQ, PepR, PepI, PepP, PepX), che mostrano attività specifica per i residui di prolina (Savijoski *et al.*, 2006).

Il catabolismo degli aminoacidi contribuisce sia alla formazione del sapore nei prodotti fermentati sia alla formazione di ammine biogene, vale a dire in aspetti positivi della qualità, ma anche in aspetti negativi per quanto concerne la sicurezza alimentare. Il catabolismo proteico dei batteri lattici ha anche la funzione di produrre energia in condizioni di scarso apporto di sostanze nutritive di natura glucidica. Tuttavia sono ancora numerose le lacune riguardanti alcune delle vie metaboliche del catabolismo proteico dei batteri lattici e molte di queste ad oggi risultano solo parzialmente caratterizzate.

Valina, leucina ed isoleucina, gli aminoacidi aromatici (tiroxina, triptofano e fenilalanina), gli aminoacidi solforati (metionina e cisteina) e la treonina sono tra i principali responsabili della formazione del sapore del prodotto finito. Altre componenti possono comunque essere coinvolte nella produzione di aromi, quali ad esempio il catabolismo dell'acido aspartico, che recentemente è stato dimostrato essere implicato nella produzione di acetoino e diacetile (Le Bars e Yvon, 2008).

Valina, leucina ed isoleucina, così come gli aminoacidi solforati possono essere degradati seguendo due distinti percorsi: la transaminazione e la degradazione vera e propria. La transaminazione può essere catalizzata da due amino transferasi, BcaT e Arat, che convertono gli aminoacidi nel loro corrispondente α -chetoacido (Yvon e Rijnen, 2001). La reazione delle transaminasi è normalmente legata alla deaminazione del glutammato ad un α -chetoglutarato catalizzata dall'enzima glutammato deidrogenasi (GDH). L'attività glutammato deidrogenasica varia molto all'interno delle varie specie di batteri lattici; la maggior parte dei ceppi di *Lc. lactis* non possiede questa attività (Lapujade *et al.*, 1998), mentre essa è caratteristica della maggioranza dei ceppi di *Str. Thermophilus* (Helinck *et al.*, 2004). Per quanto riguarda il genere *Lactobacillus* l'attività glutammato deidrogenasica sembra essere invece ceppo-specifica (Kieronczyk *et al.*, 2003). Gli α -chetoacidi possono essere ulteriormente convertiti in aldeidi, acidi carbossilici e idrossiacidi attraverso decarbossilazione ossidativa e riduzione.

I composti solforati prodotti dal catabolismo degli aminoacidi contenenti zolfo (metionina, cisteina e treonina) sono fortemente aromatici. Per questo motivo lo studio del loro catabolismo da parte dei batteri lattici è stato oggetto di molte indagini negli ultimi anni. In generale il metabolismo degli aminoacidi solforati è molto complesso, considerando l'esistenza

di molteplici vie metaboliche ed i numerosi enzimi che possono essere coinvolti. Nei lattobacilli e in *Str. thermophilus* la transaminazione tramite Arat e BcaT rappresenta comunque la principale via di degradazione della metionina (Amarita *et al.*, 2001); l'acido che ne deriva, l'acido 2-oxo-4-metiltiobutirrico può essere chimicamente convertito in metiltioaldeide, metanetiolo ed in solfuro di dimetile. Pochi invece sono i dati relativi al catabolismo della cisteina da parte dei batteri lattici. Sembra però che l'utilizzo di questo aminoacido da parte di alcuni ceppi batterici sia possibile mediante l'attività di un particolare enzima, la cistationina-gliasi, che degraderebbe l'aminoacido ad ammoniaca, idrogeno solforato e piruvato (Bruinenberg *et al.*, 1997). Questa attività è stata in particolare rilevata in alcune specie di streptococchi. La treonina può essere invece degradata ad acetaldeide mediante una treonina-aldolasi che catalizza appunto la scissione dell'aminoacido ad acetaldeide e glicina (Christensen *et al.*, 1999).

I batteri che non dispongono del patrimonio enzimatico adeguato per adattarsi alla crescita nel latte sono caratterizzati da minori tassi di duplicazione cellulare, pertanto, tendono a soccombere rispetto a quelli che colonizzano più velocemente la matrice. Questa selezione naturale, ha favorito nel tempo, l'affermarsi di sistemi caseari di batteri lattici in grado di utilizzare al meglio le sostanze azotate proprie del latte. Al tempo stesso, per comprendere il motivo della presenza nei sistemi naturali di ceppi batterici con minori attitudini alla proteolisi, dobbiamo considerare le interazioni tra batteri differenti cresciuti in miscela e, quindi, la possibilità che alcuni di questi traggano vantaggio per la loro crescita dall'attività proteolitica di altre specie. Questi ceppi possono, in alcuni tipi di prodotti, come lo yoghurt rivestire ruoli importanti ai fini dell'esito tecnologico della trasformazione (Mucchetti e Neviani, 2006).

I diversi gradi di proteolisi sono influenzati da vari fattori, quali pH, umidità e temperatura: per i lattococchi si osserva un *optimum* di azione a temperature comprese tra 30°C ed i 40°C e ad un pH tra 4,5 e 6; le proteinasi dei lattobacilli, invece, agiscono meglio con valori di pH tra 7,5 e 8. Non sempre, però, le condizioni che si verificano al termine del processo di proteolisi sono gradite: durante la prima fase di maturazione, infatti, può comparire un sapore amaro, soprattutto in formaggi a breve maturazione come la mozzarella o la crescenza, mentre in altri tipi di formaggi, come provolone e Cheddar, questo tipo di difetto può comparire anche dopo alcuni mesi di maturazione (Salvadori del Prato, 1998).

Il sapore amaro è determinato essenzialmente dalla formazione di peptidi altamente idrofobici, che derivano soprattutto dall'idrolisi della β -caseina. In alcuni casi, tuttavia, questi peptidi sono presenti solo transitoriamente e vengono degradati, più o meno rapidamente, con la maturazione. Un ruolo essenziale a questo riguardo è svolto dai batteri lattici starter e non, poiché tra i primi esistono ceppi che provocano il difetto, per cui il loro sviluppo deve essere controllato o limitato, mentre tra i secondi ne esistono alcuni in grado di eliminare rapidamente i peptidi amari, grazie alla loro intensa attività peptidasica (Mucchetti e Neviani, 2006).

Un altro aspetto controverso legato al catabolismo delle proteine è la formazione di ammine biogene, come tirosina ed istidina, dovuta alla decarbossilazione degli aminoacidi.

Se la prima fase dell'attività proteolitica in un formaggio è dovuta alle esigenze metaboliche di sviluppo dei batteri presenti, nelle fasi successive si assiste ad una intensa liberazione di endoenzimi cellulari, a seguito di autolisi da parte delle cellule batteriche stesse. L'autolisi delle cellule, generalmente, richiede molto tempo, specialmente nel caso degli streptococchi. *Lb. helveticus*, invece, impiegato nella produzione di formaggio grana come starter, subisce una rapida autolisi, evidente già dopo due o tre giorni dalla produzione, per cui, in questo caso, l'attività proteolitica per endoenzimi inizia precocemente.

Fattori importanti nel determinare la proteolisi di questa seconda fase sono la stabilità enzimatica, la concentrazione in cloruro di sodio della fase acquosa del formaggio e la temperatura di stagionatura (Bottazzi, 1993).

5.3 Resistenza agli stress osmotici e al calore

Affinché il metabolismo cellulare rimanga attivo, le condizioni intracellulari devono rimanere pressoché costanti, in relazione alla composizione ionica, pH e concentrazione di metaboliti (Csonka e Hanson, 1991). Inoltre, il mantenimento di un turgore cellulare positivo è considerato generalmente come il fattore determinante l'espansione cellulare. Poiché la parete batterica è permeabile all'acqua, ma forma una barriera per molti altri soluti, un cambiamento dell'osmolarità del mezzo può rapidamente compromettere le funzioni vitali della cellula ed i batteri devono necessariamente essere in grado di adattarsi a questi cambiamenti, al fine di sopravvivere. In generale, in condizioni iperosmotiche, riescono a farlo accumulando soluti compatibili (attraverso *uptake* o sintesi diretta), mentre in condizioni iposmotiche, i soluti vengono rilasciati o degradati. I soluti compatibili con la cellula batterica, oltre ad avere un effetto sull'equilibrio osmotico, possono anche stabilizzare alcuni enzimi e di conseguenza fornire una protezione, non solo nei confronti di stress osmotici, ma anche nei confronti di stress causati da elevate temperature, congelamento ed essiccamento (Panoff *et al.*, 2000; Poolman *et al.*, 1998; Kets *et al.*, 1996). I tre più comuni soluti compatibili con la cellula batterica sono carnitina, glicina-betaina e prolina. La prima può essere sintetizzata *ex novo* dai microrganismi, mentre ciò non è possibile per glicina-betaina e prolina.

I batteri lattici nelle varie applicazioni in industria alimentare possono essere sottoposti a stress osmotici di varia natura, in caso di aggiunta di zuccheri o sali al prodotto. Diversamente dai microrganismi enterici, quali ad esempio *Bacillus subtilis*, i batteri lattici hanno limitate o nulle capacità di sintetizzare soluti compatibili (Poolman *et al.*, 1998) e principalmente si avvalgono della capacità di incorporare tali composti dal mezzo colturale. Questo processo assicura una rapida risposta al cambiamento delle condizioni osmotiche del mezzo.

In via generale è stato osservato che i sali (KCl e NaCl) inibiscono la crescita dei batteri lattici in misura maggiore rispetto a concentrazioni equiosmolari di zuccheri (saccarosio e lattosio). Come suggerito da Glaasker *et al.* (1998), ciò può essere giustificato dal fatto che il saccarosio ed il lattosio causano uno stress osmotico transitorio, poiché la loro concentrazione internamente ed esternamente alla cellula batterica si equilibra rapidamente, come conseguenza dell'*uptake* di tali molecole da parte della cellula batterica stessa. Diversamente

da *E. coli*, per il quale la rapida accumulazione di ioni K⁺ costituisce la risposta primaria allo stress iperosmotico (Csonka e Hanson, 1991), *Lb. plantarum* non è in grado di accumulare nella cellula ioni K⁺ o Na⁺, oltre i livelli già esistenti in condizioni fisiologiche normali (Glaasker *et al.*, 1998). È stato inoltre osservato che la presenza nel mezzo di glicina-betaina, un composto ammonico quaternario, ha un effetto stimolante in condizioni di stress osmotico dovuto a sali (KCl o NaCl). Questo stesso effetto non è stato invece osservato in condizioni di stress osmotico da zuccheri.

Glaasker *et al.* (1996) hanno osservato, in esperimenti riguardanti ceppi di *Lb. plantarum* coltivati in condizioni di elevata osmolarità del mezzo, che gli aminoacidi glutammato e prolina tendevano ad accumularsi in misura maggiore all'interno della cellula batterica rispetto ad altre molecole. In presenza invece di glicina-betaina nel mezzo colturale, *Lb. plantarum* tendeva preferibilmente ad accumulare quest'ultima, a discapito del glutammato e della prolina. Così come per *Lb. plantarum*, la glicina-betaina sembra essere in grado di aumentare la resistenza a stress osmotici in *Lb. acidophilus* (Hutkins *et al.*, 1987) e *Lc. lactis* (Van der Heide *et al.*, 2000; Obis *et al.*, 1999).

L'osmolarità del mezzo oltre che influenzare il tasso di crescita nei batteri lattici, sembra anche condizionare la composizione degli acidi grassi della parete, la produzione di esopolisaccaridi (Liu *et al.*, 1998) e di batteriocine (Uguen *et al.*, 1999).

Molti sono gli studi su batteri lattici di interesse caseario che hanno indagato le caratteristiche tecnologiche dei ceppi, tra le quali la resistenza a concentrazioni crescenti di NaCl. Relativamente ai prodotti lattiero-caseari, la concentrazione di sale influenza soprattutto la fase di maturazione, poiché ha un effetto generale sui processi enzimatici e va a selezionare la microflora presente. La maggioranza dei formaggi italiani presenta una percentuale di sale sul totale che varia dall'1% al 2,5%; alcuni tipi particolari di formaggio, quale ad esempio il Pecorino Romano, ne contengono invece fino al 4-6% o addirittura all'8%. Una salatura rapida della superficie del formaggio impedisce innanzitutto lo sviluppo di alcune muffe come *Geotrichum*, senza impedire la crescita di *Penicillium*. La salatura dei formaggi inoltre garantisce la regolazione dell'acidificazione, andando ad inibire i microrganismi starter.

In generale, possiamo affermare che i lattobacilli sono relativamente resistenti alla presenza di NaCl. *Lb. acidophilus* ad esempio è in grado di tollerare anche il 18%, seppur presentando una crescita rallentata (Kim *et al.*, 2001). In una ricerca di Papamanoli *et al.* (2003) è stato osservato che ceppi di *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* e *Lb. curvatus* erano in grado di tollerare fino al 10% di NaCl nel mezzo colturale. I batteri appartenenti al genere *Lactococcus* e *Streptococcus* risultano essere invece più sensibili all'azione del sale. Questa caratteristica rappresenta tra l'altro l'oggetto di una prova fenotipica normalmente impiegata per la differenziazione delle specie *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*: la subsp. *cremoris*, a differenza della subsp. *lactis*, è infatti in grado di sviluppare in presenza del 2% di cloruro di sodio, ma non del 4% (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994). Non mancano tuttavia in bibliografia studi che mostrano l'esistenza di ceppi atipici appartenenti alla subsp. *cremoris*, in grado di crescere anche a concentrazioni di NaCl superiori al 2%. Nieto-Arribas *et al.*, ad esempio, nel 2008,

hanno sottoposto 26 ceppi di *Lc. lactis* isolati da formaggio Manchego a concentrazioni di NaCl pari al 4%, 6% e 10%: la maggior parte dei ceppi era inibita a tutte le concentrazioni testate e quasi nessun ceppo era in grado di crescere in presenza del 6% di NaCl. Solamente 6 ceppi appartenenti alla subsp *lactis* ed un ceppo appartenente alla subsp *cremoris* erano in grado di mantenere un elevato tasso di crescita (85%) sia in presenza del 4% di che del 6% di NaCl. Aumentando quindi la salatura, si condizionano le microflora anche secondarie che si sviluppano nel formaggio, con effetti sulla maturazione, soprattutto in termini di aroma. L'impiego quindi di ceppi con diversi profili di resistenza al cloruro di sodio rappresenta un'opportunità per influenzare positivamente l'aroma di un prodotto.

Per quanto riguarda invece la resistenza al calore, il maggior problema che si riscontra nella cellula batterica esposta a temperature elevate è la denaturazione delle proteine e la loro conseguente precipitazione (Somero, 1995). In più sono stati descritti fenomeni di destabilizzazione di macromolecole quali ribosomi ed RNA, nonché l'alterazione della membrana cellulare. I batteri lattici durante i processi tecnologici possono essere esposti a temperature relativamente elevate, che sono comunque compatibili con la vita dei microrganismi, pena la mancata acidificazione del mezzo e quindi il fallimento del processo tecnologico.

I batteri lattici si dividono essenzialmente in mesofili e termofili. Le specie mesofile hanno una temperatura minima di sviluppo intorno ai 10°C ed una massima di 40°C, quelle termofile sopportano una temperatura minima di 30°C fino ad una massima di 55°C. Quindi, ad esempio, è sconsigliato l'utilizzo di ceppi di *Lc. lactis* come starter o ceppi di *Lb. plantarum* o *Lb. casei* come colture secondarie se si prevede di applicare temperature superiori ad un certo range durante il processo tecnologico (cottura della cagliata o stufatura a temperatura elevata). Queste temperature potrebbero, infatti, disattivare le colture o comunque renderle disvitali, con conseguenze del tutto antieconomiche. La presenza tuttavia di ceppi, soprattutto mesofili, capaci di crescere in maniera ottimale anche a temperature più elevate rispetto al loro *optimum* potrebbe rappresentare un vantaggio da sfruttare per ottimizzare alcuni processi tecnologici.

Esistono studi in bibliografia relativi all'effetto dell'esposizione al calore di specie mesofile di batteri lattici. Un trattamento non troppo prolungato sembrerebbe indurre un adattamento a temperature elevate. Ad esempio De Angelis *et al.* (2003) hanno osservato che, esponendo il ceppo *Lb. plantarum* DPC2739, in inoltrata fase esponenziale o in fase stazionaria, a 42°C per 1 ora, la resistenza a 72°C per 90 secondi aumentava di circa 2 e 3 logaritmi, rispettivamente. Queste cellule adattate al calore risultavano inoltre più resistenti a pH 5 e a concentrazioni del 6% di NaCl. Un'elettroforesi bidimensionale ha rivelato cambiamenti nell'espressione di 31 e 18 proteine, rispettivamente in fase esponenziale inoltrata oppure in fase stazionaria. Studi simili sono presenti anche per altre specie di batteri lattici, quali *Lc. lactis* (Whitacker e Batt, 1991).

Questo aspetto potrebbe quindi rivelarsi molto interessante soprattutto per colture probiotiche che potrebbero vedere aumentata la loro capacità di resistenza nel tratto gastrointestinale in conseguenza di stress sub-letali da calore.

6. Tipizzazione batterica tramite *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Recentemente la tecnica del *Multilocus Sequence Typing* (MLST) è stata utilizzata come un nuovo approccio per la tipizzazione di batteri commensali isolati da matrici alimentari, quali *Oenococcus oeni* (De las Rivas *et al.*, 2004; Bilhere *et al.*, 2009), *Lb. casei* (Cai *et al.*, 2007; Diancourt *et al.*, 2007) and *Lb. plantarum* (De las Rivas *et al.*, 2006; Tanganurat *et al.*, 2009), al fine di ottenere una precisa ed inequivocabile caratterizzazione molecolare di ceppi isolati da microbioti autoctoni caratteristici di fermentazioni naturali oppure utilizzati come colture starter commerciali.

La tecnica MLST è stata proposta per la prima volta nel 1998 da Maiden *et al.*, come approccio valido nel fornire dati accurati e facilmente interscambiabili tra laboratori, soprattutto nell'ambito a fini epidemiologici.

La tecnica MLST è sostanzialmente una variante della tecnica *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). La differenza tra le due sta nel fatto che mentre l'MLST prevede l'analisi di sequenze nucleotidiche risultanti dall'amplificazione parziale di un set di geni *house-keeping*, l'MLEE studia la mobilità elettroforetica dei prodotti codificati da tali sequenze (Spratt, 1999).

I geni *house-keeping* sono i migliori candidati per l'analisi MLST poiché influenzati da una pressione selettiva neutra. Questi geni, codificanti per componenti fondamentali per la vita della cellula batterica, devono infatti conservare inalterate le funzioni metaboliche, evolvono lentamente e possono indicare più verosimilmente la relazione genetica tra ceppi batterici, rispetto a geni che risentono di pressione selettiva positiva, quali geni codificanti antibiotico-resistenze o geni che codificano per gli antigeni.

Nell'ambito di popolazioni soggette a ricombinazione genetica, è importante quindi avere informazioni relative a posizioni cromosomiche multiple, difficilmente ereditate mediante un singolo evento genetico (geni *house-keeping*) ed è fondamentale evitare di prendere in considerazione porzioni di genoma soggette a rapida evoluzione, in ragione forti pressioni selettive, quali ad esempio l'uso di antibiotici.

Sebbene l'MLEE abbia rappresentato una metodica importante per la genetica di popolazione batterica (Selander *et al.*, 1986), la sua laboriosità e scarsa riproducibilità interlaboratorio ha impedito l'applicazione di questa tecnica su ampia scala e per analisi di routine.

L'approccio MLST è stato successivamente costruito sulla base del successo riscosso dalla tecnica MLEE, tuttavia al fine di identificare le variazioni presenti ai loci indagati tra i vari ceppi è necessario conoscere la sequenza nucleotidica amplificata e ciò avviene inevitabilmente tramite il sequenziamento (Figura 10). Questa tecnica oggi rappresenta una tecnologia consolidata, in grado di fornire risultati facilmente validabili, conservabili e condivisibili elettronicamente.

Una volta analizzate le sequenze nucleotidiche, la tecnica MLST prevede di assegnare un numero ad ogni sequenza unica rilevata per ogni locus (allele). Per ciascun ceppo analizzato, gli alleli presenti ai diversi loci analizzati vengono poi combinati in un profilo allelico e a questa combinazione viene assegnato un identificativo "sequenza tipo" (o *sequence type*; ST), che nella

tecnica MLEE corrisponderebbe al tipo elettroforetico (o *electrophoretic type*, ET) (Maiden *et al.*, 1998).

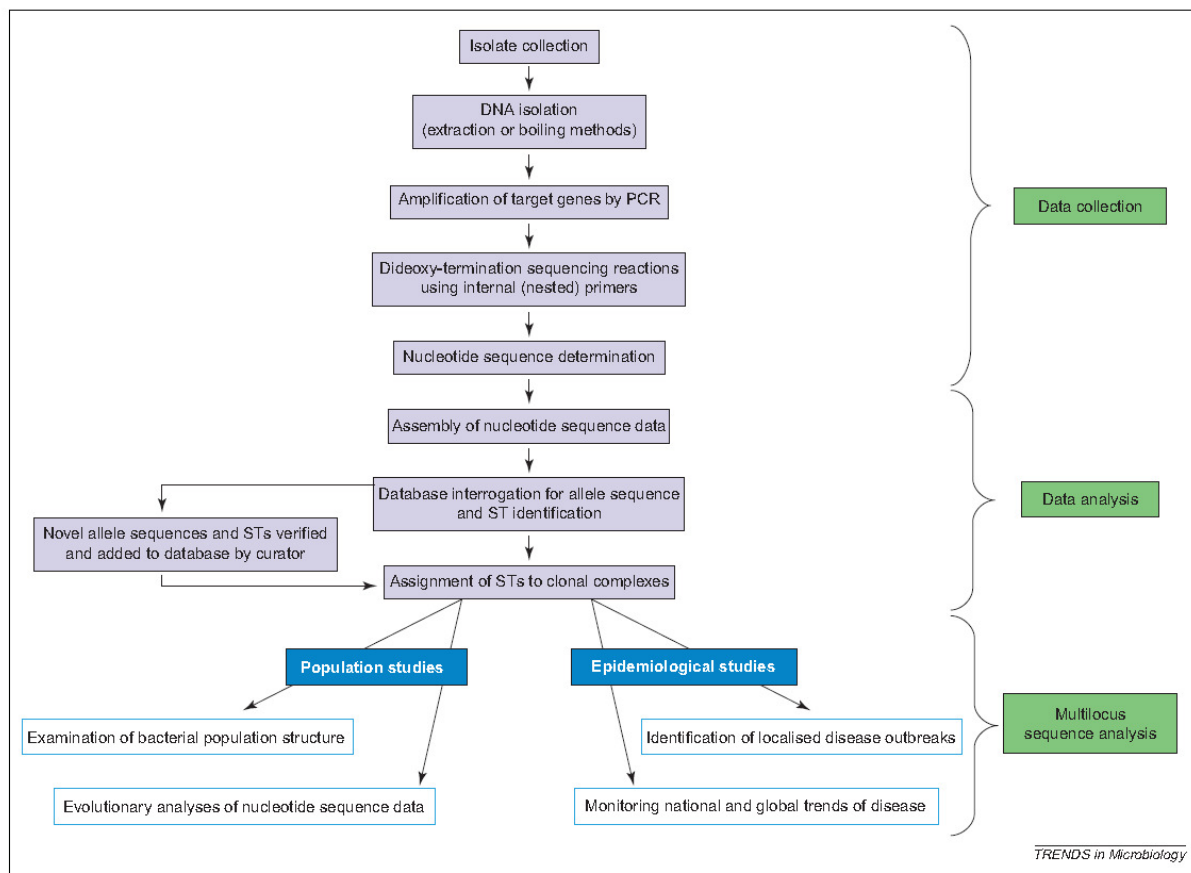


Fig.10: Schema di lavoro relativo al *Multilocus Sequence Typing* per batteri patogeni (Urwin e Maiden, 2003).

La maggiore diversità delle sequenze nucleotidiche rispetto ai profili enzimatici (presenza di mutazioni silenziose) permette, tramite la tecnica MLST, di discriminare i ceppi mediante lo studio di un numero inferiore di loci, rispetto all'MLEE. La relazione tra gli isolati si instaura a seguito della comparazione dei profili allelici: ceppi strettamente correlati avranno profili ST identici o che differiscono a livello di pochi loci, mentre ceppi diversi avranno anche diversi profili ST. Un vantaggio della tecnica MLST è che il materiale necessario per la determinazione del profilo ST è facilmente maneggiabile: del DNA o una sospensione di cellule batteriche morte, entrambi trasportabili tramite posta ordinaria, rappresentano i campioni di partenza da analizzare. Poiché i protocolli e le sequenze dei primer utilizzati sono facilmente reperibili in rete e l'MLST è un sistema quasi del tutto automatizzato (Jefferies *et al.*, 2003), questa tecnica può essere applicata su larga scala per centinaia o migliaia di campioni. Diversi protocolli MLST sono stati pubblicati per molti patogeni procarioti ed eucarioti e nuovi protocolli compaiono regolarmente in letteratura.

6.1 Messa a punto di un nuovo protocollo MLST

Gli elementi fondamentali per mettere a punto un nuovo schema MLST sono tre: la scelta dei ceppi da utilizzare per la valutazione iniziale, la scelta dei loci da caratterizzare e il disegno dei primer da utilizzare per l'amplificazione e per il sequenziamento dei loci stessi. E' raccomandabile analizzare una collezione di ceppi scelti sulla base di tipizzazioni precedenti o comunque di dati epidemiologici. Il numero ottimale di campioni dovrebbe essere di circa 100 ceppi. Questo anche per comprendere se i primer disegnati sono applicabili o meno a quanti più isolati possibile e per stabilire il livello di diversità osservata a ciascun locus amplificato. Inoltre, la collezione di ceppi analizzata dovrebbe essere rappresentativa di una popolazione batterica generale, piuttosto che rappresentare un subset di isolati, quali ad esempio campioni clinici. I geni *house-keeping*, come già accennato, sono un target di eccellenza per l'analisi MLST e la disponibilità dei genomi completi di molti microrganismi ha facilitato di molto la scelta dei loci candidati. Il numero ottimale di nucleotidi da analizzare per ciascun allele MLST varia a seconda di fattori tecnici e soprattutto economici ed è rappresentato nella maggior parte dei casi dalla lunghezza della sequenza nucleotidica che può essere facilmente determinata con un singolo sequenziamento in ciascuna direzione (*forward* e *reverse*). Nel 1996, quando sono stati messi a punto i primi protocolli MLST, questa lunghezza si aggirava intorno alle 450 bp. Sebbene oggi sia possibile analizzare frammenti di lunghezza maggiore, l'esperienza ottenuta suggerisce che frammenti di geni *house-keeping* di questa taglia sono sufficientemente informativi (Jefferies *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003; Homan *et al.*, 2002; Maiden *et al.*, 1998).

Durante lo sviluppo di un nuovo protocollo MLST è comunque buona prassi considerare un numero maggiore di loci rispetto a quelli previsti per lo schema finale. Un gene *house-keeping*, scelto per l'analisi MLST può, infatti, rivelarsi talvolta inadatto, a causa di inaspettati livelli di ricombinazione o selezione. Un sistema che prevede lo studio di pochi loci tuttavia corre il rischio di non essere informativo a causa dell'associazione casuale degli alleli. Il numero dei loci indagati può essere così aumentato al fine di ottenere risultati migliori. L'aumento del numero dei loci indagati sarà conveniente fin tanto che non si giunge al punto in cui per ogni locus aggiuntivo si otterranno poche informazioni addizionali, che non giustificano più la spesa e l'impegno richiesti. A questo punto è possibile ottenere migliori risultati, associando il profilo MLST a dati provenienti da loci più variabili, relativi a geni funzionali.

Lo schema originale per lo studio MLST di *Neisseria meningitidis* prevedeva l'indagine di sei loci, scelti tra gli undici inizialmente presi in considerazione (Maiden *et al.*, 1998); un locus addizionale (*fumC*) è stato successivamente aggiunto per conferire una maggiore informatività a livello epidemiologico (Holmes *et al.*, 1999). Molti schemi MLST sviluppati successivamente utilizzano un numero simile di loci (6-7).

Ad ogni modo, dalla messa a punto del primo protocollo MLST i criteri di scelta dei geni candidati sono cambiati. Ad esempio, la scelta di soli geni *house-keeping* è ad oggi considerata opzionale (Cooper *et al.*, 2006), mentre la scelta di loci che seguono la stessa strada evolutiva e che conseguentemente consentono la costruzione di alberi filogenetici dalla topologia congruente è essenziale.

Il disegno dei primer per l'amplificazione dei loci e per il sequenziamento rappresenta una parte importante per lo sviluppo di un nuovo schema MLST. E' fondamentale utilizzare delle tecniche che prevedono l'impiego di sonde molecolari, per cui i frammenti di DNA amplificati e studiati risultano essere di una dimensione assai maggiore rispetto a quelli considerati per l'MLST. Per cui in fase iniziale, la sequenza nucleotidica di questi frammenti è determinata utilizzando primer, interni al frammento amplificato. Questi primer generalmente garantiscono dei migliori risultati e riducono al minimo la possibilità di avere posizioni ambigue o artefatti. Successivamente, in fase di amplificazione possono essere utilizzate condizioni di PCR meno stringenti. Ciò rappresenta un vantaggio per batteri molto diversi tra di loro, che possono presentare sequenze nucleotidiche polimorfe. L'ottimizzazione delle condizioni di reazione è una fase fondamentale, seppur molto spesso sottovalutata.

Sebbene la messa a punto di uno schema MLST provvisorio ed utilizzato all'interno di un'unica unità lavorativa sia abbastanza semplice, la realizzazione di uno schema che possa essere utilizzato routinariamente in laboratori clinici rappresenta decisamente un obiettivo più complesso.

6.2 Multilocus sequence typing per lo studio di batteri lattici

Sebbene la tecnica MLST sia da tempo applicata allo studio di batteri patogeni, solo recentemente è stata applicata per lo studio di batteri commensali. La prima applicazione ha riguardato nel 2004 ceppi appartenenti alla specie *Oenococcus oeni* isolati da vini francesi, italiani, americani, tedeschi e spagnoli. Questi ceppi erano stati precedentemente tipizzati tramite *ribotyping* e lo studio dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP). La prima tecnica ha permesso di raggruppare i ceppi in due *cluster*, mentre tramite RFLP non sono state messe in evidenza differenze tra i ceppi analizzati. Al contrario l'analisi tramite MLST ha permesso di evidenziare una sostanziale diversità genetica tra ceppi indagati. Tutti i profili ST riscontrati rappresentavano un unico ceppo, che poteva quindi essere discriminato dagli altri mediante la sua particolare combinazione di alleli (de las Riva *et al.*, 2004).

Questo primo successo ha aperto la strada verso l'approfondimento della tecnica MLST applicata a diverse specie di batteri lattici e la messa a punto di nuovi protocolli specifici per le diverse specie.

Sempre de las Rivas e colleghi, nel 2006, hanno messo a punto uno schema MLST per lo studio di ceppi di *Lb. plantarum*, basato sull'amplificazione di 7 diversi loci. Tale schema è stato messo a punto a partire da soli 16 ceppi precedentemente caratterizzati tramite *ribotyping* e analisi del profilo RFLP della regione 16S-23S (ISR, *intergenic spacer region*). Anche in questo caso, mentre il *ribotyping* raggruppava i ceppi in soli 4 *cluster* e tramite l'analisi RFLP non era possibile mettere in evidenza differenze tra i ceppi, con la tecnica MLST venivano riscontrati 14 profili ST tra i 16 ceppi analizzati, 12 dei quali unici.

Nello stesso anno, il 2007, due gruppi di lavoro diversi, quello di Diancourt e quello di Cai, hanno esplorato la possibilità di indagare la specie *Lb. casei* tramite MLST.

Nel lavoro di Diancourt *et al.* (2007), 52 ceppi appartenenti alle specie *Lb. casei* e *Lb. paracasei* sono stati caratterizzati genotipicamente attraverso diverse metodiche: studio del polimorfismo di lunghezza dei frammenti amplificati (AFLP), MLST relativo a 7 geni *house-keeping* (*fusA*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *pyrG*, *recA*, e *recG*) ed infine analisi del numero variabile di ripetizioni in tandem a loci multipli (*multilocus variable-number tandem repeats*, MLVA) indagando 9 loci diversi. E' stata riscontrata una concordanza tra la variabilità genetica rilevata attraverso i tre diversi metodi. Per i sette loci indagati tramite MLST sono stati rilevati un numero di alleli variabile da un minimo di 3 ad un massimo di 12, con un numero di profili ST totale pari a 31. Un profilo ST (ST1) è stato rilevato come più frequente (caratteristico di 17 ceppi), tutti gli altri profili ST erano invece rappresentativi di un solo ceppo. I tentativi di differenziare ulteriormente i 17 ceppi con lo stesso profilo ST tramite gli altri metodi di genotipizzazione non hanno dato esito positivo.

Nello studio di Cai e colleghi (2007) si mette invece a confronto la tecnica MLST con l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE). Sono stati considerati 40 ceppi di *Lb. casei* isolati da diverse matrici, quali piante, tratto gastrointestinale umano, sangue umano, formaggi di diversa provenienza geografica. Lo schema MLST messo a punto ha preso in considerazione 6 geni *house-keeping* (*ftsZ*, *metRS*, *mutL*, *nrdD*, *pgm* e *polA*). Il confronto dei risultati ottenuti dall'MLST e dalla PFGE ha rivelato in questo caso un maggiore potere discriminante della tecnica elettroforetica.

Sempre per quanto riguarda il genere *Lactobacillus*, la tecnica dell'MLST ha permesso recentemente di evidenziare una nuova subspecie di *Lb. delbrueckii* (Tanigawa e Watanabe, 2011). Ad oggi, quindi, *Lb. delbrueckii* risulta divisa in 4 subspecie: *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *indicus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. La precedente classificazione era invece essenzialmente basata su aspetti prevalentemente fenotipici. Nello studio di Tanigawa e colleghi è stato preso in considerazione anche l'aspetto legato al genoma, ponendo a confronto i profili AFLP e quello MLST, derivante dall'analisi di 7 geni *house-keeping* (*fusA*, *gyrB*, *hsp60*, *ileS*, *pyrG*, *recA* e *recG*). I 41 ceppi di *Lb. delbrueckii* studiati sono stati divisi in ben 34 profili ST, 29 dei quali unici. I profili ST sono stati a loro volta suddivisi in otto gruppi, rappresentativi di differenti subspecie. In particolare il ceppo *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* YIT 0080T si differenziava evidentemente da tutti gli altri ceppi classificati come appartenenti a quella stessa subspecie. Lo schema MLST sviluppato potrebbe quindi rappresentare un valido strumento per differenziare *Lb. delbrueckii* a livello di subspecie. Alcuni recenti studi si sono concentrati anche sul genere *Lactococcus*. Rademaker e colleghi nel 2007 hanno sviluppato uno schema MLST specifico per *Lactococcus* spp, utilizzato successivamente anche da altri autori, quali Fernandez *et al.* (2011). Questo schema comprendeva l'analisi di porzioni dei geni *atpA*, *rpoA*, *pheS*, *pepN*, *bcaT*, *pepX* e 16S rRNA. I ceppi indagati erano sia di origine casearia che di origine diversa. Un *subset* di 89 ceppi appartenenti alle specie *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* sono stati utilizzati per la messa a punto di un nuovo schema MLST. Dall'analisi dei dati ottenuti si sono delineati 2 gruppi principali: uno rappresentato da ceppi con genotipo "*cremoris-like*", comprendente sia

ceppi appartenenti alla subsp. *cremoris* che alla subsp. *lactis*, ed uno rappresentato da ceppi con genotipo “*lactis-like*”, comprendente solamente ceppi appartenenti alla subsp. *lactis*, tra cui alcuni appartenenti alla biovar. *diacetylactis*. Un terzo gruppo minore è stato messo in evidenza: era rappresentato da due ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* di origine non casearia.

Fernandez *et al.*, nel 2011, hanno successivamente utilizzato lo schema MLST messo a punto da Rademaker (2007) ed hanno paragonato i profili ST di 21 ceppi di *Lc. lactis* (alcuni dei quali dal fenotipo *lactis* ed altri dal fenotipo *cremoris*), con i dati ottenuti da un’ampia caratterizzazione tecnologica, allo scopo di definire la relazione filogenetica intercorrente tra i ceppi e valutare la loro potenziale candidatura come colture starter. I ceppi erano stati selezionati sulla base di tipizzazione tramite PFGE e RFLP. Attraverso queste analisi era stata evidenziata la diversità genotipica dei ceppi, ad eccezione di tre isolati dal genotipo *cremoris*, che mostravano identici profili elettroforetici. Per quanto riguarda l’analisi tramite MLST, anche in questo caso i ceppi ricadevano in due gruppi distinti, a seconda del loro genotipo (*cremoris* o *lactis*). Sono stati evidenziati profili ST unici per ciascun ceppo, tuttavia molte delle variazioni nucleotidiche osservate si sono rivelate imputabili all’appartenenza alle due sottospecie diverse considerate (*lactis* e *cremoris*), piuttosto che a ceppi diversi. In più, molte delle sostituzioni osservate si sono rivelate poi silenziose, cioè non in grado di determinare un cambiamento nella sequenza aminoacidica. Lo schema messo a punto da Rademaker *et al.* (2007) necessita quindi di ulteriori accorgimenti volti ad ottenere risultati maggiormente informativi.

Nuovi schemi MLST specifici per la specie *Lc. lactis* non sono tardati ad arrivare: ad esempio, Passerini *et al.* nel 2010 hanno sviluppato un nuovo schema MLST, utilizzando un approccio razionale definito dagli autori stessi “*top-down*”, criticando anche fortemente, i protocolli utilizzati da altri. Il loro approccio è consistito di varie fasi: la scelta dei ceppi per la messa a punto del nuovo schema è stata condotta a partire da 76 ceppi totali. Questi sono stati caratterizzati fenotipicamente e genotipicamente mediante diversi metodi (*ribotyping*, ARDRA e sequenziamento parziale del gene 16S rDNA). Diciotto ceppi sono stati scartati alla fine di questa prima fase. I rimanenti 57 ceppi sono stati sottoposti ad analisi PFGE. Ulteriori 21 isolati sono stati esclusi poiché presentanti profili PFGE identici. Trentasei ceppi sono stati così considerati per lo studio. I loci inizialmente considerati da Passerini e colleghi (2010) per il nuovo schema ammontavano a ben 33. Tra questi vi erano sia *marker* utilizzati comunemente in altri schemi MLST, inclusi i 5 loci usati da Rademaker *et al.* (2007), che indicatori della diversità globale tra specie batteriche (*recN*, *glyA* e *metS[metG]*). Successivamente, sono stati scelti 14 loci (*bcaT*, *glyA*, *pgk*, *dprA*, *pfk*, *comX*, *metS*, *mutX*, *rpoA*, *recN*, *tkt*, *pepXP*, *pdp* e *xerS*) e interamente sequenziati in un *subset* di 13 ceppi, con differenti livelli di diversità genomica rilevata tramite PFGE. Cinque loci sono stati subito scartati: tre (*comX*, *mutX*, e *xerS*) perché fornivano sequenze troppo corte e di scarsa qualità, uno (*rpoA*), perché dava un basso segnale filogenetico, con soli tre SNPs rilevati tra i 13 ceppi e l’ultimo (*metS[metG]*) perché non permetteva di distinguere chiaramente la sottospecie *lactis* dalla *cremoris*. Lo *step* successivo dello studio ha previsto per ciascuno dei nove loci rimanenti di determinare le regioni maggiormente polimorfe (<500 bp in lunghezza) in ciascun ceppo. Infine, lo schema MLST è

stato ottimizzato per dare il miglior compromesso tra un ridotto numero di loci da sequenziare ed un elevato numero di profili ST generati. I sei loci *pepXP*, *recN*, *pdp*, *pgk*, *glyA* e *bcaT* sono risultati essere i migliori candidati per il nuovo protocollo proposto, con un numero da 10 a 13 alleli per locus e 26 profili ST ottenuti tra i 36 ceppi analizzati. Questi loci sono uniformemente distribuiti nel cromosoma, sono rappresentati da tre geni *house-keeping* (*glyA*, *pgk*, e *pdp*), due geni catabolici (*bcaT* e *pepXP*) e un gene della regione regolatrice SOS (*recN*). Solamente due loci considerati da Rademaker *et al.* (2007) sono stati compresi nel nuovo protocollo (*bcaT* e *pepXP*).

7. Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi di Dottorato è stato quello di caratterizzare ceppi di batteri lattici isolati da pecorini tradizionali a latte crudo prodotti in Toscana senza aggiunta di colture starter commerciali.

Tale caratterizzazione ha previsto dapprima la valutazione della sicurezza dei ceppi, tramite lo studio del profilo di resistenza agli antibiotici, secondo le linee guida EFSA 2012. Successivamente per ciascun ceppo è stata effettuata una caratterizzazione tecnologica preliminare, che ha previsto la valutazione di diversi aspetti rilevanti per l'impiego sia come colture starter che come colture secondarie: attività acidificante, attività proteolitica globale, resistenza al sale ed alla temperatura, abilità a fermentare diversi zuccheri e a produrre enzimi. Infine è stata effettuata la tipizzazione dei ceppi tramite metodica del *Multilocus Sequence Typing* (MLST) al fine di giungere ad una corretta ed inequivocabile identificazione di ceppo, basata su tecniche fenotipiche, ma supportata anche da metodiche di biologia molecolare.

I ceppi così caratterizzati potranno essere utilizzati nella realizzazione di prodotti caseari toscani, che saranno valorizzati non soltanto dalle tecniche casearie tradizionali utilizzate per la loro realizzazione, ma anche dall'impiego di colture starter o secondarie autoctone.

8. Materiali e metodi

8.1 Ceppi batterici

La presente tesi di dottorato ha previsto l'impiego di 54 ceppi di batteri lattici (Tabella 2 e 3). precedentemente isolati da pecorini tradizionali toscani prodotti a latte crudo senza l'impiego di colture starter industriali ed identificati genotipicamente mediante PCR specie-specifica. I ceppi in esame erano suddivisi in 28 isolati appartenenti al genere *Lactobacillus* e 26 isolati appartenenti al genere *Lactococcus*. Nello specifico i ceppi appartenevano alle seguenti specie: *Lc. lactis* subsp *lactis* (n=16), *Lc. lactis* subsp *cremoris* (n=8), *Lc. raffinolactis* (n=2), *Lb. paracasei* (n=12) e *Lb. plantarum* (n=16) I ceppi appartenenti alla collezione American Type Culture Collection ATCC334, ATCC20174 e ATCC19435 sono stati utilizzati come ceppi di referenza.

Tab.2: Ceppi di *Lactobacillus* spp impiegati nel presente lavoro, nome ceppo, sigla, provenienza, specie

Ceppo	Sigla	Provenienza	Specie
Lb FS60 IIE	Lb1	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb plantarum</i>
Lb FS45 IIC	Lb2	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb plantarum</i>
Lb FP7 IE	Lb3	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb plantarum</i>
Lb FP28 IC	Lb4	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb plantarum</i>
Lb FS 60 II A	Lb5	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb plantarum</i>
Lb FS 60 II C	Lb6	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb paracasei</i>
S1 F28 b 119	Lb7	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3F7 PT C	Lb9	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3L PT B	Lb10	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3F7 PT F	Lb11	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3F7 PT E	Lb12	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3F2 PT E	Lb13	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3 F42 g	Lb14	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb paracasei</i>
Lb F40 E	Lb15	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb paracasei</i>
Lb F40e	Lb16	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb paracasei</i>
Lb F40 D	Lb17	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3 LC	Lb18	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb paracasei</i>
Lb 3 F28 b	Lb19	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb plantarum</i>
Lb 3F7 C	Lb20	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb plantarum</i>
Lb 3F14 b	Lb21	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb plantarum</i>
Lb 3 F7 d	Lb22	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lb plantarum</i>
Lb 26	Lb23	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 27	Lb24	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 28	Lb25	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 29	Lb26	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 30	Lb27	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 31	Lb28	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
Lb 32	Lb29	Pecorino della Lunigiana	<i>Lb plantarum</i>
ATCC14917	ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>
ATCC334	ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>

Tab.3: Ceppi di *Lactococcus* spp impiegati nel presente lavoro, nome ceppo, sigla, provenienza, specie

Ceppo	Sigla	Provenienza	Specie
S1 F42 C 154	Lc1	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc lactis lactis</i>
S3 F14 h 84	Lc2	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc lactis lactis</i>
S1 F14 H 97	Lc3	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc lactis lactis</i>
S1 F28 A 98	Lc4	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc lactis lactis</i>
Siena Cagl Lc F	Lc5	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc raffinolactis</i>
SIENA LATTE Lc D	Lc6	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc raffinolactis</i>
S1 F42 d (D) 155	Lc7	Pecorino delle Colline Senesi	<i>Lc lactis lactis</i>
3F7 PTA	Lc8	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F7 PTC	Lc9	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F7 PTH	Lc10	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lc lactis lactis</i>
3F7 PTF	Lc11	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lc lactis lactis</i>
3F14 PT B	Lc12	Pecorino della Montagna Pistoiese	<i>Lc lactis lactis</i>
8 F28 C	Lc13	Pecorino della Lunigiana	<i>Lc lactis lactis</i>
8F28 D	Lc14	Pecorino della Lunigiana	<i>Lc lactis lactis</i>
8 F28 E	Lc15	Pecorino della Lunigiana	<i>Lc lactis lactis</i>
8 F28 G	Lc16	Pecorino della Lunigiana	<i>Lc lactis lactis</i>
3F7F	Lc17	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F7E	Lc18	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F7D	Lc19	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F7B	Lc20	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F2F	Lc21	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis lactis</i>
3F2E	Lc22	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis lactis</i>
3F2D	Lc23	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis lactis</i>
3F2C	Lc24	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
3F2B	Lc25	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis lactis</i>
3F2A	Lc26	Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli	<i>Lc lactis cremoris</i>
ATCC19435	ATCC 19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>

8.2 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

I ceppi selezionati sono stati sottoposti a valutazione del profilo di antibiotico resistenza mediante metodiche fenotipiche (diffusione su piastra e metodo delle micro diluizioni). Gli antibiotici presi in considerazione sono stati: ampicillina (AMP), vancomicina (VA), gentamicina (CN), kanamicina (K), streptomicina (S), eritromicina (E), clindamicina (DA), tetraciclina (TE) e cloramfenicolo (C).

La selezione degli antibiotici da testare è stata condotta prendendo a riferimento il documento EFSA del 2012 (Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed).

8.2.1 Diffusione su piastra (metodo di Kirby-Bauer)

Per la valutazione dell'antibiotico resistenza mediante diffusione su piastra si è proceduto secondo la metodica illustrata da Bauer *et al.* nel 1966, apportando alcune modifiche.

Il protocollo operativo ha previsto la rivitalizzazione dei ceppi da testare mediante brodo LSM (Lactic acid bacteria Susceptibility test Medium) (Klare *et al.*, 2005), incubato per 18-24 ore a 30°C (lattococchi) o 37°C (lattobacilli) in condizioni di aerobiosi.

Le colture così ottenute sono state centrifugate per 10 minuti a 3500 rpm; il surnatante è stato eliminato ed il *pellet* cellulare è stato risospeso in soluzione fisiologica sterile fino a raggiungere una densità ottica di 0,1 (625 nm), pari al punto 1 della scala di torbidità di McFarland (Figura 11), approssimativamente corrispondente ad una concentrazione cellulare di $300 \cdot 10^6$ UFC/ml.



Fig.11: Standard della scala di torbidità Mcfarland, (www.microbelibrary.org)

Una volta standardizzato l'inoculo si è proceduto con la semina della coltura tramite tampone sterile su piastre Petri contenenti LSM agar.

Successivamente, dischetti di nitrocellulosa imbibiti del principio antimicrobico attivo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati applicati sulla piastra, mediante pinze sterili (Figura 12). Le

piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C in anaerobiosi (lattobacilli) o a 30°C in aerobiosi (lattococchi).

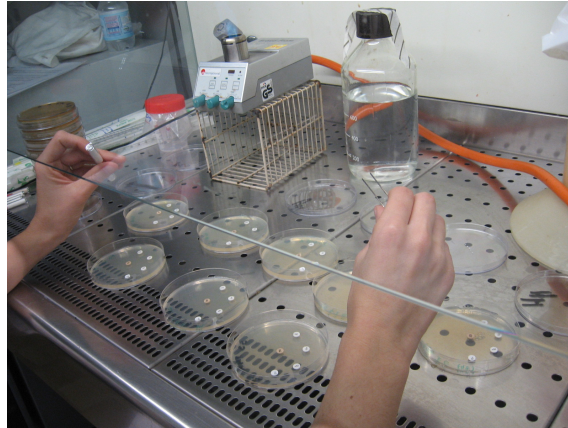


Fig.12: I dischetti antibiotici sono applicati sulle Piastre Petri mediante pinze sterili (foto personale)

Il diametro degli aloni di inibizione (Figura 13) formati per effetto della diffusione dell'antibiotico dal dischetto di nitrocellulosa all'agar, è stato misurato (mm) e confrontato con i *range* proposti da Charteris *et al.* (1998) per la discriminazione dei batteri lattici in ceppi sensibili, mediamente sensibili o resistenti (Tabella 4).



Fig.13: Aloni di inibizione su LSM agar (foto personale)

Tab.4: Antibiotici testati e relativi diametri di riferimento (mm) per l'interpretazione dei risultati secondo Charteris *et al.*(1998).

Gruppo		Antibiotico	Concentrazione dischetto (µg)	R	MS	S
Inibitori della sintesi della parete batterica	Penicilline	Ampicillina	10	≤ 12	13-15	≥16
	Glicopeptidi	Vancomicina	30	≤ 14	15-16	≥17
Inibitori della Sintesi proteica	Aminoglicosidi	Gentamicina	10	≤ 12	-	≥13
		Kanamicina	30	≤ 13	14-17	≥18
		Streptomicina	10	≤ 11	12-14	≥15
	Tetracicline	Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥19
	Fenicoli	Cloramfenicolo	30	≤ 13	14-17	≥18
	Macrolidi	Eritromicina	15	≤ 13	14-17	≥18
	Lincosamidi	Clindamicina	2	≤ 8	9-11	≥12

R: resistente; MS: mediamente suscettibile; S: sensibile

8.2.2 Determinazione del valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.) mediante metodo delle microdiluzioni

La quantificazione del valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C) è stata effettuata secondo il protocollo operativo proposto dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) nel 2007, apportando opportune modifiche al fine di adattare la metodica al gruppo dei batteri lattici.

Per ciascun antibiotico da testare è stata preparata una soluzione madre concentrata. La scelta di tale concentrazione è stata effettuata in base al valore di *cut-off* stabilito dall'EFSA (2012) per ogni specifico antibiotico. E' stata quindi preparata una soluzione madre 100 volte più concentrata rispetto al valore di *cut-off* proposto.

I ceppi sono stati rivitalizzati in terreno ottimale per la crescita (MRS o M17) per 18-24 h a 37°C e dopo sviluppo sono stati inoculati in brodo LSM (18-24 ore a 37°C).

Le colture sono state centrifugate per 10 minuti a 3500 rpm, è stato eliminato il surnatante ed il *pellet* cellulare è stato risospeso in soluzione fisiologica sterile fino a raggiungere una densità ottica pari a 0,5 punti della scala di torbidità McFarland (corrispondente ad una concentrazione cellulare di $150 \cdot 10^6$ UFC/ml).

Al fine di determinare il valore di M.I.C. di ogni ceppo relativo a ciascun antibiotico è stata utilizzata una micropiastra. Nei pozzetti della prima colonna della micropiastra sono stati dispensati 190 µl di brodo LSM contenente la concentrazione massima di antibiotico da testare, ottenuto per diluizione della soluzione madre. Negli altri pozzetti della micropiastra sono stati aggiunti 95 µl di brodo LSM privo di antibiotico. Le ultime due colonne della micropiastra sono state riservate rispettivamente al controllo positivo ed al controllo negativo.

Dai pozzetti della prima colonna sono stati prelevati 95 µl di terreno con antibiotico e sono stati miscelati con i rispettivi pozzetti della seconda colonna. L'operazione è stata ripetuta per i pozzetti successivi al fine di ottenere diluizioni scalari dell'antibiotico (Figura 14).

Infine, in ogni pozzetto, tranne in quelli dedicati al controllo negativo, sono stati inoculati 5 μ l di sospensione batterica precedentemente standardizzata.

La micropiastra è stata quindi incubata per 48 ore a 37°C in anaerobiosi (lattobacilli) oppure per 24 ore a 30°C in aerobiosi (lattococchi).

Dopo incubazione è stata valutata la crescita batterica nei pozzetti e quantificato il valore di M.I.C. (ppm) relativo ai singoli antibiotici. La lettura della micropiastra è stata effettuata con il metodo “a vista” descritto dal CLSI (2007). E' stata assunta come Minima Concentrazione Inibente la concentrazione di antibiotico contenuta nel pozzetto che precedeva la comparsa di torbidità. I valori ottenuti sono stati confrontati con i *cut-off* proposti dall'EFSA nel 2012 (Figura 15).

I ceppi che hanno presentato un valore di M.I.C. inferiore o uguale al *cut-off* sono stati considerati sensibili. Quelli che al contrario hanno presentato un valore di M.I.C. superiore al *cut-off* sono stati considerati resistenti.

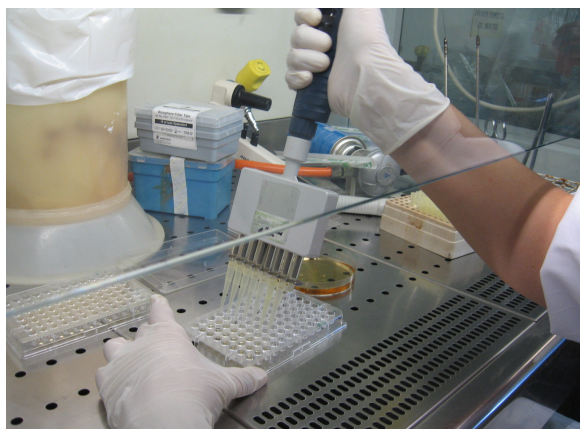


Fig.14: Diluizioni scalari dell'antibiotico in micro piastra (foto personale)

Table 1. Microbiological cut-off values (mg/L)

	ampicillin	vancomycin	gentamycin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^a	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^b	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative ^c	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei /paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus</i> spp	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
Other Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2

n.r. not required.
^aincluding *L. delbrueckii*, *L. helveticus*
^bincluding *L. fermentum*
^cincluding the homofermentative species *L. salivarius*

 Fig.15: Valori di *cut-off* per la distinzione di microrganismi resistenti e sensibili (EFSA, 2012)

8.3 Ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici

I ceppi che hanno mostrato un fenotipo resistente verso gli antibiotici testati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA plasmidico al fine di individuare la presenza di geni codificanti per tali resistenze a livello di elementi genetici mobili.

Il DNA plasmidico è stato estratto mediante il kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) apportando alcune modifiche a quanto raccomandato dal produttore. Tali modifiche erano finalizzate all'aumento della concentrazione di DNA plasmidico estratto da cellule di batteri Gram+.

A partire da una coltura *overnight* dei ceppi in brodo MRS o M17, 2 ml sono stati centrifugati a 6000 rpm per 2 min. Il *pellet* batterico è stato risospeso in 250 µl di buffer P1 (addizionato di lisozima in concentrazione pari a 15 mg/ml), trasferito in una *ependorf* ed incubato a 37°C per 30 min. Dopo aver aggiunto 250 µl di buffer P2 la *ependorf* è stata capovolta gentilmente per 4-6 volte in modo da mescolarne il contenuto, fino a che non è stata ottenuta una soluzione viscosa. Dopo aver aggiunto 350 µl di buffer N3, la *ependorf* è stata immediatamente capovolta per 4-6 volte con delicatezza.

Il tutto è stato centrifugato a 13000 rpm per 10 min. A questo punto il surnatante è stato trasferito in una "QIAprep Spin Column" e centrifugato a 13000 rpm per 1 min. La "QIAprep Spin Column" è stata successivamente lavata aggiungendo 0,5 ml di buffer PB e centrifugando a 13000 rpm per 1 min. Il liquido residuo dal lavaggio è stato eliminato. Un ulteriore lavaggio è stato poi effettuato aggiungendo 0,75 ml di buffer PE e centrifugando a 13000 rpm per 1 min. Il liquido residuo dal lavaggio è stato nuovamente scartato. Un'ultima centrifugazione a 13000 rpm per 1 min è stata effettuata al fine di eliminare residui eventuali del buffer di lavaggio.

La "QIAprep Column" è stata infine messa in una nuova *ependorf* da 1,5 ml. Sono stati quindi aggiunti al centro della colonna 50 µl di buffer EB (10 mM Tris Cl, pH 8,5). Dopo 1 min a temperatura ambiente le *ependorf* sono state centrifugate a 13000 rpm per 1 min.

Il DNA plasmidico così ottenuto è stato utilizzato quale template in reazioni di PCR seguendo specifici protocolli in relazione al gene da amplificare. In Tabella 5 sono riportati i riferimenti bibliografici necessari al fine di individuare le condizioni di reazione per ogni specifica PCR.

Tab.5: Specifiche relative alle reazioni di PCR effettuate per la ricerca dei geni codificanti resistenze agli antibiotici.

Gene amplificato	Resistenza codificata	Dimensioni dell'amplificato	Riferimento bibliografico
<i>tet(W)</i>	tetraciclina	168 bp	Aminov <i>et al.</i> , 2001
<i>tet(L)</i>	tetraciclina	696 bp	Gevers <i>et al.</i> , 2003
<i>tet(S)</i>	tetraciclina	169 bp	Aminov <i>et al.</i> , 2001
<i>tet(M-O)</i>	tetraciclina	1115 bp	Bartocci <i>et al.</i> , 2004
<i>tet(M)</i>	tetraciclina	740 bp	Olsvik <i>et al.</i> , 1995
<i>cat</i>	cloramfenicolo	300 bp	Hummel <i>et al.</i> , 2007
<i>catIP501</i>	cloramfenicolo	506 bp	Aarestrup <i>et al.</i> , 2000
<i>strA</i>	streptomicina	548 bp	Ouoba <i>et al.</i> , 2008
<i>strB</i>	streptomicina	509 bp	Ouoba <i>et al.</i> , 2008

8.4 Caratterizzazione tecnologica dei ceppi

I ceppi sono stati sottoposti ad una caratterizzazione tecnologica, al fine valutarne l'ideoneità per l'utilizzo nell'ambito di processi di caseificazione, come colture starter o colture secondarie. Questa caratterizzazione ha previsto una valutazione delle seguenti attitudini:

- attività acidificante
- attività proteolitica
- resistenza a concentrazioni crescenti di cloruro di sodio
- resistenza a temperature crescenti
- caratterizzazione delle attività enzimatiche/fermentative mediante API50 CH (lattobacilli) e API20 Strep (lattococchi)

8.4.1 Valutazione dell'attività acidificante

I ceppi testati sono stati opportunamente rivitalizzati mediante coltivazione nei rispettivi terreni di coltura. Nello specifico i ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* sono stati rivitalizzati mediante semina in 6 ml di brodo MRS, mentre i ceppi appartenenti al genere *Lactococcus* sono stati coltivati in 6 ml di brodo M17; entrambi sono stati incubati alle rispettive temperature ottimali di crescita per 24 ore in aerobiosi (37°C per i lattobacilli; 30°C per i lattococchi).

I ceppi sono stati successivamente inoculati in ragione dell'1% in latte magro ricostituito al 10% (Skim Milk, Oxoid, Milano, Italia) ed incubati nuovamente alle temperature ottimali di crescita. Il pH è stato misurato con pH-metro 8705 (Delta Ohm) dopo 2, 6 e 24 ore di incubazione. Ciascuna misurazione è stata effettuata tre volte. Il risultato è stato espresso come Δ pH, cioè come differenza tra il valore medio di pH dello skim milk non inoculato (controllo) ed il valore medio di pH per ciascun campione trascorsi i due intervalli di tempo.

8.4.2 Valutazione dell'attività proteolitica mediante metodica spettrofotometrica

Il metodo di analisi impiegato per la determinazione dell'attività proteolitica dei ceppi è basato sulla reazione dell'o-ftaldialdeide (OPA) con le ammine primarie. Questa reazione avviene solamente in presenza di un tiolo, di solito il β -mercaptoetanol, in condizioni di pH basico (Church *et al.*, 1983). Roth è stato il primo ad utilizzare questo metodo per la determinazione degli amminoacidi (1971).

La reazione con le ammine primarie è stata descritta dettagliatamente da Simons e Johnson (1976) e determina la formazione di un 1-tioalchil-2-alchilisoindolo, quale prodotto finale. Tale prodotto è in grado di assorbire fortemente a 340 nm (Simons e Johnson, 1976; Simons e Johnson, 1978). In Figura 16, R rappresenta l'aminoacido, il peptide o la proteina contenente l'ammina primaria.

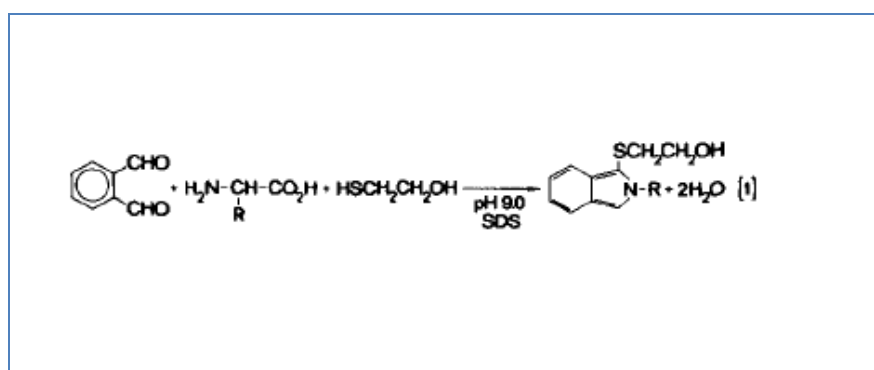


Fig.16: Proteina contenente l'ammina primaria (Church *et al.*, 1983)

Questo metodo è semplice, rapido e sensibile (è in grado di rilevare approssimativamente una concentrazione pari a 7 mM di ammine primarie), poiché l'OPA permette la formazione di composti con assorbanza simile per la maggior parte degli amminoacidi. Gli svantaggi di questa metodica sono che l'OPA causa una reazione debole con la cisteina e nessuna con la prolina.

La preparazione dei campioni ha previsto diverse fasi: i ceppi di lattococchi e lattobacilli conservati a -80°C sono stati rivitalizzati rispettivamente in brodo M17 e MRS ed incubati alle temperature ottimali di crescita per 10-12 ore.

Successivamente, sono stati inoculati in ragione dell'1% in provette contenenti 10 ml di latte magro in polvere ricostituito al 10% e sterilizzato in autoclave a 110°C per 30 minuti.

I campioni così preparati sono stati incubati alle temperature ottimali di crescita per i ceppi testati per 24 ore, insieme ad un campione di controllo.

Una volta trascorso il periodo di incubazione, si è proceduto con la preparazione del reattivo O.P.A., operazione da svolgere esclusivamente al momento dell'utilizzo del reattivo stesso.

I componenti del reattivo O.P.A. erano i seguenti:

- 25 ml di Na-tetraborato 0,1 M
- 2 ml di sodiododecil-solfato (SDS) al 20%

- 1 ml di orto-ftaldialdeide (40 mg disciolti in 1 ml di metanolo)
- 100 μ l di β -mercaptoetanololo

Una volta aggiunti i componenti necessari, sono stati portati a volume di 50 ml con acqua distillata.

Allestimento della retta di taratura

Al fine di allestire la retta di taratura necessaria per l'espressione del risultato finale, è stata preparata una soluzione madre di glicina ad una concentrazione di 1,5 mg/ml, sciogliendo 193,98 mg di glicinato sodico in 100 ml di acqua.

Successivamente sono stati prelevati 2,5 ml di soluzione standard di glicina, poi precipitati con 5 ml di acido tricloracetico (TCA): così facendo si è ottenuta una diluizione 1:3 della soluzione madre di glicina ovvero una concentrazione di glicina pari a 0,5 mg/ml, equivalenti a 0,5 μ g/ μ l.

A questo punto si è proceduto con l'allestimento delle diluizioni scalari della soluzione madre di glicina secondo il seguente schema:

- Prelevare 5 μ l di soluzione madre (equivalenti a 2,5 μ g di glicina) e portare a volume di 50 μ l con acqua distillata
- Prelevare 10 μ l di soluzione madre (equivalenti a 5 μ g di glicina) e portare a volume di 50 μ l con acqua distillata
- Prelevare 20 μ l di soluzione madre (equivalenti a 10 μ g di glicina) e portare a volume di 50 μ l con acqua distillata
- Prelevare 30 μ l di soluzione madre (equivalenti a 15 μ g di glicina) e portare a volume di 50 μ l con acqua distillata
- Prelevare 40 μ l di soluzione madre (equivalenti a 20 μ g di glicina) e portare a volume di 50 μ l con acqua distillata
- Prelevare 50 μ l di soluzione madre (equivalenti a 25 μ g di glicina)

Seguendo il procedimento sopra riportato sono state ottenute delle concentrazioni scalari di glicina pari a:

- 0,05 μ g di glicina/ml
- 0,1 μ g di glicina/ml
- 0,2 μ g di glicina/ml
- 0,3 μ g di glicina/ml
- 0,4 μ g di glicina/ml
- 0,5 μ g di glicina/ml

Le diluizioni scalari sono state preparate in triplicato al fine di poter effettuare 3 misurazioni.

Allo stesso tempo si è proceduto alla preparazione del "bianco", aggiungendo a 2,5 ml di acqua distillata 5 ml di TCA. Successivamente, è stato aggiunto 1 ml di reattivo OPA a tutte le diluizioni

di soluzione madre di glicina compreso il bianco. Si è proceduto, infine, con la lettura dei campioni allo spettrofotometro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Biosciences) a 340 nm.

Metodica O.P.A.

Per ciascun ceppo da testare, compreso il campione di controllo, si è proceduto secondo la seguente metodica:

- Prelevare 2,5 ml di campione da 10 ml di latte coagulato
- Aggiungere 0,5 ml di acqua e precipitare con 5 ml di acido tricloroacetico (TCA) 0,72 N (118 g TCA portati a 1 litro con acqua distillata)
- Agitare e dopo 10 minuti filtrare su carta Watman n.1
- Controllare la limpidezza del filtrato rispetto al campione di controllo: se torbido, centrifugare a 3000 giri per 10-15 minuti a 4°C, se limpido proseguire nella determinazione
- Prelevare 50 µl di filtrato e aggiungere 1 ml di reattivo O.P.A.
- Agitare e lasciare riposare per 2 minuti a temperatura ambiente
- Procedere con la lettura spettrofotometrica a 340 nm

Espressione del risultato

Una volta ottenuta la retta di regressione, per mezzo di campioni contenenti quantità note di glicina/ml, utilizzando l'equazione della retta è stato possibile calcolare la quantità di aminoacidi liberati.

Essendo l'equazione della retta $y = a + b x$

dove:

- y = valore di assorbanza
- x = quantità di amminoacidi liberati (µg equivalenti di glicina)
- a = intercetta
- b = coefficiente angolare della retta

Esplicitando il valore da noi ricercato, si ha:

$$x = (y - a)/b$$

Con a , b e y noti, si calcola l'incognita x .

Poiché è stato utilizzato un quantitativo di campione pari a 50 µl, volendo esprimere il risultato finale in µg di glicina/ml, il valore ottenuto (x) dovrà essere moltiplicato per un fattore pari a 20.

8.4.3 Resistenza a diverse concentrazioni di cloruro di sodio

E' stata valutata la capacità dei ceppi isolati (*Lactobacillus* e spp *Lactococcus* spp) di crescere a diverse concentrazioni di sale (5%, 6% e 6,5% p/v) alla temperatura di 30 in brodo M17 e di

37°C in brodo MRS, a seconda del genere considerato. I ceppi sono stati inoculati in ragione dell'1% nei brodi colturali addizionati con NaCl ed incubati alle temperature ottimali di crescita per 18-24 ore. Lo sviluppo dei ceppi in brodo è stato considerato ottimale, debole o nullo valutando "a vista" lo sviluppo degli stessi in brodo.

8.4.4 Resistenza a diverse temperature

E' stata valutata la capacità dei ceppi isolati (*Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp) di crescere a diverse temperature (40°C, 43°C e 45°C) in brodo MRS o M17, a seconda del genere considerato. I ceppi sono stati inoculati in ragione dell'1% nei brodi colturali ed incubati alle temperature da testare per 18-24 h. Lo sviluppo dei ceppi in brodo è stato considerato ottimale, debole o nullo valutando "a vista" lo sviluppo degli stessi in brodo.

8.4.5 Caratterizzazione delle attività enzimatiche/fermentative mediante API system

I ceppi oggetto di studio sono stati oggetto di caratterizzazione metabolica mediante gallerie API (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Sono stati utilizzati i sistemi API50 CH e API20 Strep per la caratterizzazione rispettivamente di lattobacilli e lattococchi.

8.4.5.1 Caratterizzazione di *Lactobacillus* spp. mediante API50 CH

Il sistema API 50 CH è un kit standardizzato che consente, attraverso lo studio del metabolismo dei carboidrati da parte dei microrganismi testati, l'identificazione fenotipica di batteri quali *Lactobacillus*, *Lactococcus* e generi affini.

Il kit è basato su 50 test biochimici ed è utilizzato in associazione con API 50 CHL Medium ed identifica i microrganismi tramite il risultato della fermentazione di 49 zuccheri. La fermentazione è evidenziata da una variazione di colore nella microprovetta (da blu a giallo), dovuta alla produzione di acido in anaerobiosi, rivelata dall'indicatore di pH contenuto nel mezzo utilizzato.

Preparazione delle gallerie e dell'inoculo

Il kit API è provvisto di una vaschetta da incubazione e da un involucro sterile nel quale si trovano le 5 strisce contenenti le microprovette.

Sulla base della vaschetta da incubazione vi sono degli alveoli nei quali viene distribuita acqua distillata o demineralizzata, per impedire l'eccessivo essiccamento delle gallerie durante il periodo d'incubazione.

Sopra gli alveoli sono state quindi sistemate le cinque strisce di gallerie, facendo attenzione a rispettare la numerazione delle microprovette. La vaschetta è inoltre dotata di una linguetta laterale sulla quale deve essere annotato il numero identificativo del ceppo testato.

I lattobacilli in esame conservati a -80°C sono stati rivitalizzati mediante coltivazione in MRS agar. Una volta ottenuta la coltura fresca in terreno agarizzato, questa è stata raccolta con un

tampone sterile ed inoculata all'interno di tubi contenenti soluzione fisiologica sterile. In questo modo è stata ottenuta una sospensione batterica madre.

A partire da quest'ultima, è stata preparata una sospensione pari alla torbidità 2 della scala di McFarland (corrispondente approssimativamente ad una concentrazione cellulare di $6 \cdot 10^8$ UFC/ml), annotando i millilitri di soluzione madre necessari a raggiungere tale torbidità.

Successivamente, è stato necessario prelevare dalla sospensione batterica madre una quantità doppia rispetto ai millilitri impiegati per raggiungere il grado di torbidità richiesto ed inocularla all'interno di una fiala di API 50 CHL Medium.

Inoculo delle gallerie

Con il supporto di una pipetta sterile, la sospensione batterica è stata distribuita nelle 50 microprovette della galleria, tenendo la vaschetta leggermente inclinata, in modo evitare la formazione di bolle all'interno delle provette stesse.

Dopo aver inoculato tutte le microprovette, ciascuna di esse è stata ricoperta con della paraffina sterile, fino a formare un menisco convesso. In questo modo si vengono a creare le condizioni di anaerobiosi necessarie alla fermentazione dei carboidrati.

Le gallerie così preparate sono state incubate a 37°C per 48 ore.

Lettura ed interpretazione della galleria

L'interpretazione dei risultati è stata effettuata valutando in ciascuna provetta l'acidificazione prodotta, che si traduce in caso di positività, nel viraggio al giallo del bromocresolo porpora contenuto nell'API 50 CHL Medium (Figura 17). Per il test esculina (test 25), in caso di positività, si osserva invece un viraggio dal viola al nero.

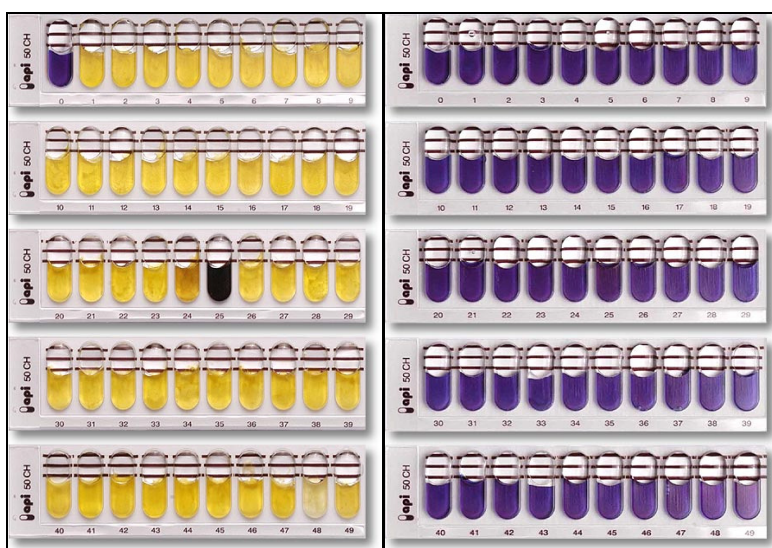


Fig.17: API 50 CH, controllo positivo e negativo (www.mediclim.ro)

8.4.5.2 Caratterizzazione di *Lactococcus* spp. mediante API20 Strep

Il sistema API20 Strep è un sistema standardizzato composto da 20 test biochimici ad elevata discriminazione. Permette di identificare a livello di gruppo o di specie la maggior parte degli streptococchi, degli enterococchi e degli altri germi più comuni ad essi correlati (*Leuconostoc* spp, *Lactococcus* spp, *Aerococcus* spp. etc.).

La galleria API20 Strep è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati per la rivelazione delle attività enzimatiche o della fermentazione degli zuccheri.

Per i test enzimatici l'inoculo è costituito da una sospensione densa, ottenuta da una coltura pura, che consente la reidratazione del substrato enzimatico. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione sono evidenziate da un viraggio cromatico spontaneo o successivo all'aggiunta dei reattivi ausiliari. Per i test fermentativi l'inoculo è costituito da un terreno arricchito (contenente un indicatore di pH) che consente la reidratazione degli zuccheri. La fermentazione dei carboidrati comporta un processo di acidificazione che si traduce in un viraggio cromatico spontaneo dell'indicatore.

Di seguito sono specificate le procedure di preparazione delle gallerie e dell'inoculo e la procedura di inoculo stesso delle gallerie.

Preparazione delle gallerie e dell'inoculo

Il kit API è provvisto di una vaschetta da incubazione e da un involucro sterile nel quale si trova una striscia contenente le 20 microprovette.

Sulla base della vaschetta da incubazione vi sono degli alveoli nei quali viene distribuita acqua distillata o demineralizzata, per impedire l'eccessivo essiccamento delle gallerie durante il periodo d'incubazione.

Sopra gli alveoli sono state quindi sistemate le cinque strisce di gallerie, facendo attenzione a rispettare la numerazione delle microprovette. La vaschetta è inoltre dotata di una linguetta laterale sulla quale deve essere annotato il numero identificativo del ceppo testato.

I lattococchi in esame conservati a -80°C sono stati rivitalizzati mediante coltivazione in M17 agar. Una volta ottenuta la coltura fresca in terreno agarizzato, questa è stata raccolta con un tampone sterile ed inoculata all'interno di tubi contenenti 2 ml di acqua distillata sterile oppure Api Suspension Medium, fino a raggiungere una concentrazione corrispondente al punto 4 della scala di McFarland (corrispondente approssimativamente ad una concentrazione cellulare di $12 \cdot 10^8$ UFC/ml).

Inoculo delle gallerie

Con il supporto di una pipetta sterile, la sospensione batterica è stata distribuita nella prima metà delle microprovette della galleria (test da VP a ADH), tenendo la vaschetta leggermente inclinata, in modo da evitare la formazione di bolle all'interno delle provette stesse. Nella seconda metà delle microprovette (test da RIB a GLYG) è stata dispensata invece una soluzione costituita da API GP Medium addizionato con 0,5 ml della soluzione batterica precedentemente preparata.

Le cupole dei test da ADH a GLYG sono stati riempiti con olio di paraffina sterile fino a formare un menisco convesso. In questo modo si vengono a creare le condizioni di anaerobiosi necessarie alla fermentazione dei carboidrati.

Le gallerie così preparate sono state incubate a 30°C per 24 ore.

Letture ed interpretazione della galleria

Dopo 4 ore di incubazione, sono stati aggiunti ad alcuni test reattivi specifici per la rivelazione della reazione: al test VP è stata aggiunta una goccia di VP1 e una goccia di VP2, al test HIP sono state aggiunte due gocce di NIN, ai test PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP sono stati aggiunti una goccia di ZYMA e una goccia di ZYMB.

Dopo 10 minuti di attesa a temperatura ambiente sono state lette le reazioni, secondo il riferimento fornito (Figura 18).

Successivamente si è proceduto con la reincubazione della vaschetta API per la lettura dei test mancanti a 24 ore (ESC, ADH e da RYB a GLYG), senza rileggere i test enzimatici già interpretati.



Fig.18: API20 Strep, controllo positivo e negativo (www.tgw1916.net)

8.5 Selezione dei ceppi e studio della loro biodiversità mediante metodo genotipico

Multilocus Sequence Typing (MLST)

I ceppi che presentavano diverse caratteristiche metaboliche e tecnologiche sono stati selezionati per essere sottoposti ad analisi della biodiversità mediante metodica *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Tale metodica consente di discriminare i diversi ceppi sulla base del loro genoma. Sono stati amplificati loci multipli, situati sia su geni *house-keeping*, che su geni *housekeeping* e funzionali, mediante la tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Per quanto riguarda la specie *Lactobacillus paracasei* è stato seguito il protocollo suggerito da Diancourt *et al.* (2007), amplificando regioni parziali di DNA situate sui seguenti geni conservati:

- gene elongation factor EF-2 (*fusA*)
- isoleucyl-tRNA synthetase (*ileS*)
- GTP-binding protein LepA (*lepA*)
- leucyl-tRNA synthetase (*leuS*)
- CTP synthetase (*pyrG*)
- recombinase A (*recA*)
- ATP-dependent DNA helicase (*recG*)

Il ciclo di PCR impiegato era così composto: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, 30 cicli di 94°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi, estensione finale a 72°C per 5 minuti.

Nella Tabella 6 sono riportate le specifiche relative ai *primer* utilizzati, temperature di *annealing*, dimensioni degli ampliconi e alla dimensione dei frammenti analizzati.

Tab.6: *Lactobacillus paracasei*: geni amplificati, primer, temperature di annealing e dimensione degli amplificati (Diancourt et al., 2007).

Gene amplificato	Primer forward	Primer reverse	Temperatura annealing (°C)	Dimensioni amplicone (bp)
<i>fusA</i>	CCGTAATATCGGGATCATGGCTCACATCGA	CAACAACATCTGAACACCCTTGTT	55	786
<i>ileS</i>	TCCTGGTTGGGATACTCACGG	AGGAACCGGAATCGAACCACACATC	55	1321
<i>lepA</i>	CATGCCCCACATTGATCACGGGAA	CATATGCAGCAAGCCTAAGAACCC	55	1017
<i>leuS</i>	GGGACGGTTGTTGCAAACGAAGAAGT	CGGTTCACCCCAATAACGCT	55	794
<i>pyrG</i>	GGGGTCGTATCGTCATTGGGTAAAGG	GGAATGGCAATGATTCGATATCGCCAA	55	435
<i>recA</i>	CCGAAAAGTCCGGCAAACAAC	CGCGACCACCTGGTGTGTTTTTC	55	439
<i>recG</i>	AGGCGATGTTGGGAGCGGTAAAAC	GTGTTCCGGGAATAGGCGTCGC	55	406

Relativamente alle specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris* è stato seguito il protocollo descritto da Rademaker et al. (2007), amplificando regioni parziali dei seguenti geni:

- ATP synthase alpha subunit (*atpA*)
- phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit (*pheS*)
- RNA polymerase alpha subunit (*rpoA*)
- branched-chain aminotrasferase (*bcaT*)
- peptidase N (*pepN*)
- X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (*pepX*)

Il ciclo di PCR impiegato era così composto: denaturazione iniziale a 95°C per 3 minuti, 30 cicli di 94°C per 15 secondi, 30 secondi alla temperatura di *annealing* specifica per i primer utilizzati, 72°C per 2 minuti e 15 secondi, estensione finale a 72°C per 4 minuti.

Nella Tabella 7 sono riportate le specifiche relative ai *primer* utilizzati, alle temperature di *annealing*, dimensioni degli ampliconi e alla dimensione dei frammenti analizzati.

Tab.7: *Lactococcus lactis*: geni amplificati, primer, temperature di annealing e dimensioni degli amplificati (Rademaker et al., 2007).

Gene amplificato	Primer forward	Primer reverse	Temperatura annealing (°C)	Dimensioni amplicone (bp)
<i>rpoA</i>	ATGATYGARTTTGAAAAACC	ACHGTRTRATDCCDGCRCG	46	814
<i>atpA</i>	TAYRTYGGKAYGGDATYGC	CCRCGRTHARYTHGCYTG	50	1141
<i>bcaT</i>	TTTKSHRTGCCDGTWGG	GGWCCHACTTCYGYTC	46	493
<i>pepN</i>	ATKTCTTAYGCWGAYRTYGT	TTKCTCAAGSMAWGSCC	50	620
<i>pepX</i>	TTTGGGTTGAAAGTCCAGT	CCAAGAAGAAATCCAGC	46	602
<i>pheS</i>	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	CCWARVCCRAARGCAAARCC	50	475

Inoltre, per entrambi i generi analizzati è stato amplificato il gene 16S rRNA secondo il protocollo riportato da Vickerman *et al.* (2007). Le sequenze dei primer forward e reverse erano rispettivamente 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3'. Il ciclo di PCR ha previsto una denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti, 30 cicli di 95°C per 60 secondi, annealing a 55°C per 60 secondi, 72°C per 60 secondi ed estensione finale a 72°C per 7 minuti. La dimensione dell'amplificato atteso era di 1300 bp, il frammento analizzato ha avuto una dimensione pari a 1156 bp.

I prodotti di PCR sono stati purificati mediante Zymo PCR kit (DNA Clean & Concentrator™) seguendo le istruzioni del fornitore. I primer forward utilizzati per le reazioni di PCR sono stati utilizzati per il sequenziamento dei frammenti amplificati. Le sequenze ottenute sono state allineate, tagliate e confrontate. I pattern di similarità sono stati analizzati e sono stati costruiti alberi filogenetici con il metodo di Neighbour-Joining (Saitou e Nei, 1987). Questo metodo utilizza la matrice delle distanze per la costruzione dell'albero filogenetico. L'algoritmo alla base di questo metodo ha il compito di individuare l'albero senza radice che minimizzi la somma delle lunghezze dei vari rami. Il bootstrap test è stato applicato per stimare la robustezza del metodo. Il bootstrap test consiste nel ricampionamento delle sequenze allineate in modo da avere multiallineamenti simulati. Questo permette la costruzione di differenti matrici delle distanze e di differenti alberi di filogenesi. L'ultimo passaggio è rappresentato da un calcolo dell'affidabilità dei nodi dell'albero. Un nodo è affidabile se ottiene un consenso almeno del 50%. Le analisi sono state condotte utilizzando il software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

9. Risultati e Discussioni

9.1 Valutazione dell'antibiotico-resistenza

9.1.1 Diffusione su piastra (metodo di Kirby-Bauer)

La valutazione dei profili di antibiotico-resistenza secondo il metodo di diffusione su agar ha prodotto per il genere *Lactobacillus* i risultati riportati in Tabella 8. Per ciascun ceppo sono riportati i profili di resistenza. La sigla R (in rosso) indica un ceppo resistente, MS (in blu) indica un ceppo mediamente sensibile e S un ceppo sensibile.

Tab.8: Profili di resistenza relativi ai ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus*

Sigla	Provenienza	Specie	TE	E	AMP	CN	K	DA	C	S
Lb1	PCS	<i>Lb plantarum</i>	MS	S	S	S	R	MS	S	nd
Lb2	PCS	<i>Lb plantarum</i>	MS	S	S	S	R	MS	S	nd
Lb3	PCS	<i>Lb plantarum</i>	MS	S	S	S	R	MS	S	nd
Lb4	PCS	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb5	PCS	<i>Lb plantarum</i>	MS	S	S	S	R	S	S	nd
Lb6	PCS	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
Lb7	PCS	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	MS
Lb9	PMP	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
Lb10	PMP	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
Lb11	PMP	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	MS
Lb12	PMP	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	S
Lb13	PMP	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	MS
Lb14	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	MS
Lb15	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
Lb16	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	MS
Lb17	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	R	S	S	R
Lb18	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	S	S	S	S	MS	S	S	MS
Lb19	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb20	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	MS	S	S	S	MS	S	S	nd
Lb21	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	MS	S	S	nd
Lb22	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	MS	S	S	nd
Lb23	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	MS	S	S	nd
Lb24	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb25	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb26	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb27	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
Lb28	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	S	S	S	nd
Lb29	PL	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	S	S	S	nd
ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>	S	S	S	S	R	S	S	nd
ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli
S: sensibile; MS: mediamente sensibile; R: resistente; nd: non determinato

Nella Tabella 9 sono riportate le percentuali di sensibilità (S), media sensibilità (MS) e resistenza (R) riscontrate nei ceppi analizzati appartenenti al genere *Lactobacillus*.

Tab.9: Percentuale di ceppi di *Lactobacillus* spp sensibili (S), mediamente sensibili (MS) e resistenti (R) secondo il metodo di diffusione su agar

Antibiotici	S (%)	MS (%)	R (%)
Tetraciclina	83,33	16,67	0
Eritromicina	100	0	0
Ampicillina	100	0	0
Gentamicina	100	0	0
Kanamicina	10	16,67	73,33
Clindamicina	90	10	0
Cloramfenicolo	100	0	0
Streptomicina	15,39	46,15	38,46

Relativamente al genere *Lactobacillus* è stato possibile osservare la presenza di ceppi resistenti solamente nei confronti di due antibiotici, entrambi appartenenti al gruppo degli aminoglicosidi: kanamicina (73,33%) e streptomicina (38,46%). Nei confronti degli stessi antibiotici sono stati osservati fenomeni di media sensibilità, con percentuali del 16,67% e del 46,15%, rispettivamente. Inoltre, anche per clindamicina e tetraciclina sono stati osservati ceppi mediamente sensibili, seppur con percentuali contenute (10% e 16,67%, rispettivamente). Tutti i ceppi sono risultati essere sensibili nei confronti di eritromicina, ampicillina, cloramfenicolo e gentamicina.

La valutazione dei profili di antibiotico-resistenza secondo il metodo di diffusione su agar ha prodotto per il genere *Lactococcus* i risultati riportati in Tabella 10. Per ciascun ceppo sono riportati i profili di resistenza. La sigla R (in rosso) indica un ceppo resistente, MS (in blu) indica un ceppo mediamente sensibile e S un ceppo sensibile.

Tab.10: Profili di resistenza relativi ai ceppi appartenenti al genere *Lactococcus*

Sigla	Provenienza	Specie	TE	E	AMP	CN	K	DA	C	VA	S
Lc1	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc2	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc3	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc4	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc5	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc6	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc7	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc8	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc9	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc10	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc11	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	R
Lc12	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc13	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc14	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc15	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc16	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
Lc17	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	MS	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc18	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc19	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Lc20	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc21	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc22	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lc23	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc24	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc25	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Lc26	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
ATCC 19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM:

Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

S: sensibile; MS: mediamente sensibile; R: resistente

Nella Tabella 11 sono riportate le percentuali di sensibilità (S), media sensibilità (MS) e resistenza (R) riscontrate nei ceppi appartenenti al genere *Lactococcus*.

Tab.11: Percentuale di ceppi di *Lactococcus* spp sensibili (S), mediamente sensibili (S) e resistenti (R) secondo il metodo di diffusione su agar

Antibiotici	S (%)	MS (%)	R (%)
Tetraciclina	88,90	3,70	7,40
Eritromicina	100	0	0
Ampicillina	100	0	0
Gentamicina	100	0	0
Kanamicina	66,67	29,63	3,70
Clindamicina	100	0	0
Cloramfenicolo	100	0	0
Vancomicina	100	0	0
Streptomicina	25,92	33,33	40,75

I ceppi di *Lactococcus* spp testati sono risultati essere tutti sensibili nei confronti della maggior parte degli antibiotici testati: eritromicina, ampicillina, gentamicina, clindamicina, cloramfenicolo, vancomicina. La percentuale maggiore di resistenza è stata osservata nei confronti di streptomicina (40,75%), che presentava anche una buona percentuale di ceppi mediamente sensibili (33,33%). Basse percentuali di resistenza sono state osservate nei confronti di tetraciclina e kanamicina (7,40% e 3,70%, rispettivamente). Alcuni ceppi sono risultati essere inoltre mediamente sensibili verso questi ultimi due antibiotici: il 29,63% nei confronti di kanamicina e il 3,70% nei confronti di tetraciclina.

9.1.2 Determinazione del valore di Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.) mediante metodo delle microdiluizioni

La determinazione dei valori di M.I.C. secondo il metodo delle microdiluizioni ha prodotto per il genere *Lactobacillus* i risultati riportati in Tabella 12. Per ciascun antibiotico è riportata la minima concentrazione inibente relativa allo specifico ceppo in mg/l (ppm). I valori corrispondenti ad una resistenza sono indicati in rosso.

Tab.12: Valori di M.I.C (mg/l) relativi a *Lactobacillus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	TE	E	AMP	CN	K	DA	C	S
Lb1	PCS	<i>Lb plantarum</i>	64	0,25	1	8	64	1	16	nd
Lb2	PCS	<i>Lb plantarum</i>	128	0,25	2	8	64	0,125	16	nd
Lb3	PCS	<i>Lb plantarum</i>	128	0,25	0,5	4	64	1	16	nd
Lb4	PCS	<i>Lb plantarum</i>	128	0,25	0,5	8	128	0,062	8	nd
Lb5	PCS	<i>Lb plantarum</i>	128	0,25	0,5	8	128	0,5	16	nd
Lb6	PCS	<i>Lb paracasei</i>	4	0,25	2	8	64	0,125	8	32
Lb7	PCS	<i>Lb paracasei</i>	2	0,125	1	4	32	0,125	8	32
Lb9	PMP	<i>Lb paracasei</i>	2	0,125	2	16	64	0,125	8	32
Lb10	PMP	<i>Lb paracasei</i>	2	0,125	2	16	64	0,125	8	64
Lb11	PMP	<i>Lb paracasei</i>	8	1	0,5	8	64	0,031	16	128
Lb12	PMP	<i>Lb paracasei</i>	16	0,25	0,5	8	64	0,031	16	128
Lb13	PMP	<i>Lb paracasei</i>	8	0,25	0,5	8	64	0,062	8	128
Lb14	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	4	0,125	1	4	32	0,25	8	32
Lb15	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	32	0,125	1	4	64	0,25	8	32
Lb16	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	8	0,25	1	4	64	0,125	8	32
Lb17	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	4	0,25	2	8	64	0,062	4	32
Lb18	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	8	0,125	1	8	64	0,125	8	32
Lb19	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	64	0,25	0,5	4	32	0,062	8	nd
Lb20	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	64	0,25	0,5	8	32	<0,0155	8	nd
Lb21	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,13	8	64	<0,0155	8	nd
Lb22	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	1	4	64	<0,0155	8	nd
Lb23	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	1	16	0,062	8	nd
Lb24	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	1	16	<0,0155	8	nd
Lb25	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	2	32	<0,0155	16	nd
Lb26	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	1	16	<0,0155	16	nd
Lb27	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	1	64	<0,0155	16	nd
Lb28	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,5	2	32	0,25	16	nd
Lb29	PL	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	2	1	32	0,031	16	nd
ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>	32	0,25	0,25	2	32	0,5	8	nd
ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>	4	0,125	2	4	32	0,125	4	16

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli
nd: non determinato

Nella Tabella 13 sono riportate le percentuali di sensibilità (S) e resistenza (R) riscontrate nei ceppi di *Lactobacillus* spp analizzati mediante il metodo delle microdiluizioni.

Tab.13: Percentuale di ceppi di *Lactobacillus* spp sensibili (S) e resistenti (R) secondo il metodo delle microdiluizioni

Antibiotici	S (%)	R (%)
Tetraciclina	53,33	46,67
Eritromicina	100	0
Ampicillina	100	0
Gentamicina	100	0
Kanamicina	93,33	6,67
Clindamicina	100	0
Cloramfenicolo	33,33	66,67
Streptomicina	76,93	23,07

I ceppi testati si sono rivelati tutti sensibili nei confronti di eritromicina, ampicillina, gentamicina e clindamicina. Una consistente percentuale di resistenza è stata osservata nei confronti di cloramfenicolo (66,67%) e tetraciclina (46,67%), mentre percentuali di resistenza più contenute si sono riscontrate nei confronti di streptomicina (23,07%) e kanamicina (6,67%).

La determinazione dei valori di M.I.C. secondo il metodo delle microdiluizioni ha prodotto per il genere *Lactococcus* i risultati riportati in Tabella 14. Per ciascun antibiotico è riportata la minima concentrazione inibente relativa allo specifico ceppo in mg/l (ppm). I valori corrispondenti ad una resistenza sono indicati in rosso.

Tab.14: Valori di M.I.C (mg/l) relativi a *Lactococcus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	TE	E	AMP	CN	K	DA	C	VA	S
Lc1	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	0,125	0,25	4	16	<0,06	4	0,5	8
Lc2	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,25	0,125	0,125	1	4	<0,06	4	0,5	4
Lc3	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,25	0,125	0,25	2	8	<0,06	4	0,5	4
Lc4	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,25	0,125	0,25	2	4	<0,06	4	0,5	8
Lc5	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	0,25	0,031	0,06	2	4	<0,06	2	0,5	4
Lc6	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	0,25	0,031	0,06	1	4	<0,06	2	0,5	<2
Lc7	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	0,125	0,25	4	8	<0,06	4	0,5	8
Lc8	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,5	0,125	0,25	8	16	0,125	4	0,5	16
Lc9	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,5	0,125	0,25	4	8	0,125	4	0,5	16
Lc10	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	0,25	0,25	16	32	0,25	4	0,5	16
Lc11	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	1	0,25	0,25	8	16	0,125	8	0,5	16
Lc12	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	0,25	0,125	0,25	8	32	0,125	4	0,5	16
Lc13	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	1	0,25	0,5	8	16	0,25	4	0,5	32
Lc14	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	1	0,25	0,25	16	32	0,25	8	0,5	32
Lc15	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	1	0,25	0,25	16	32	0,25	8	0,5	16
Lc16	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	0,125	0,5	8	32	0,25	8	0,5	16
Lc17	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	64	0,06	0,125	<0,5	<0,125	<0,06	2	0,3	<2
Lc18	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	64	0,031	0,125	<0,5	<0,125	<0,06	2	0,5	8
Lc19	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	1	0,06	0,25	4	8	0,125	4	0,5	<2
Lc20	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	64	0,06	0,125	<0,5	<0,125	<0,06	2	0,5	4
Lc21	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	2	0,125	0,25	2	8	0,125	8	0,5	8
Lc22	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	2	0,125	0,25	4	16	0,125	8	0,5	4
Lc23	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	1	0,25	0,25	2	8	0,125	8	0,5	4
Lc24	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	1	0,125	0,25	2	8	0,125	8	0,5	8
Lc25	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	2	0,25	0,25	2	8	0,125	8	0,5	4
Lc26	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	1	0,125	0,25	4	8	0,25	4	1	4
ATCC19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	0,125	0,25	<0,5	<1	0,125	4	0,5	<2

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

Nella Tabella 15 sono riportate le percentuali di sensibilità (S) e resistenza (R) riscontrate nei ceppi di *Lactococcus* spp analizzati mediante il metodo delle microdiluizioni.

Tab.15: Percentuale di ceppi di *Lactococcus* spp sensibili (S) e resistenti (R) secondo il metodo delle microdiluizioni

Antibiotici	S (%)	R (%)
Tetraciclina	88,88	11,12
Eritromicina	100	0
Ampicillina	100	0
Gentamicina	100	0
Kanamicina	100	0
Clindamicina	100	0
Cloramfenicolo	100	0
Vancomicina	100	0
Streptomicina	100	0

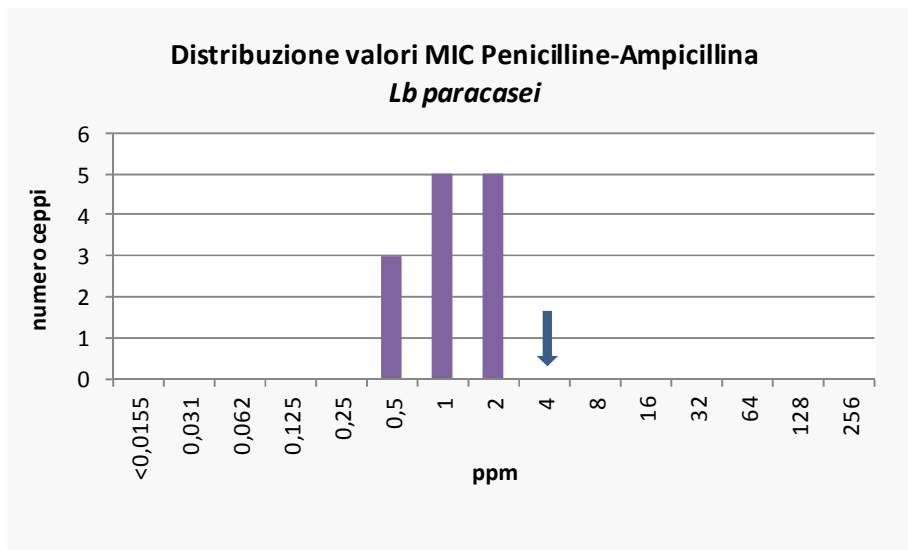
Per *Lactococcus* spp la situazione che si è presentata in base all'analisi dei valori di M.I.C. ottenuti è stata molto chiara. Il 100% dei ceppi è risultato essere sensibile per tutti gli antibiotici testati, tranne che per tetraciclina, dove è stato possibile rilevare una bassa percentuale di resistenza (11,12%).

9.1.2.1 Distribuzione dei valori di M.I.C. (ppm) per *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp

Nei grafici seguenti (Grafico 1-Grafico 24) sono mostrate le distribuzioni dei valori di M.I.C. relative ai ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Poiché l'EFSA indica valori di *cut off* diversi per le specie *Lb. plantarum* e *Lb. casei/paracasei*, sono stati costruiti grafici diversi per ciascuna di queste specie.

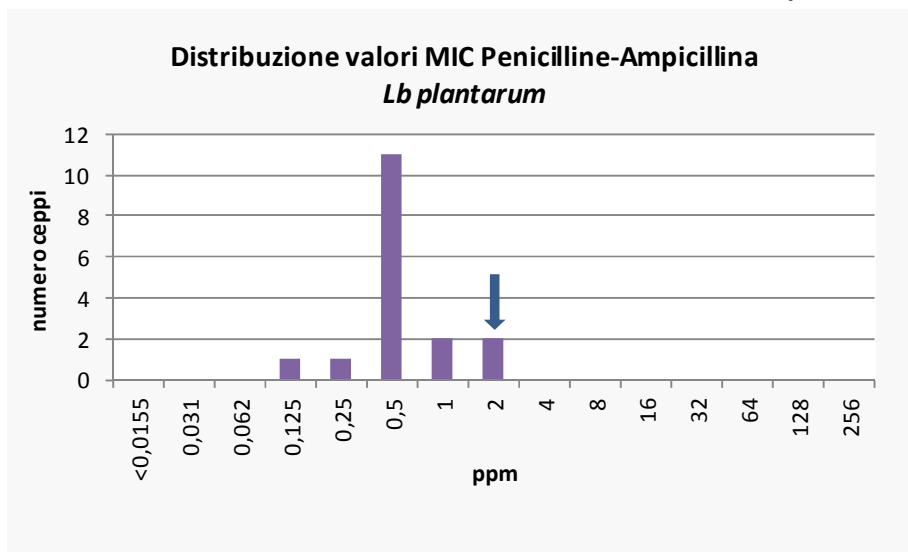
Tutti i ceppi con valore di M.I.C. \leq al valore di *cut off* sono considerati sensibili, al contrario i ceppi con valore di M.I.C. $>$ al *cut off* sono considerati resistenti.

Graf.1: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per ampicillina



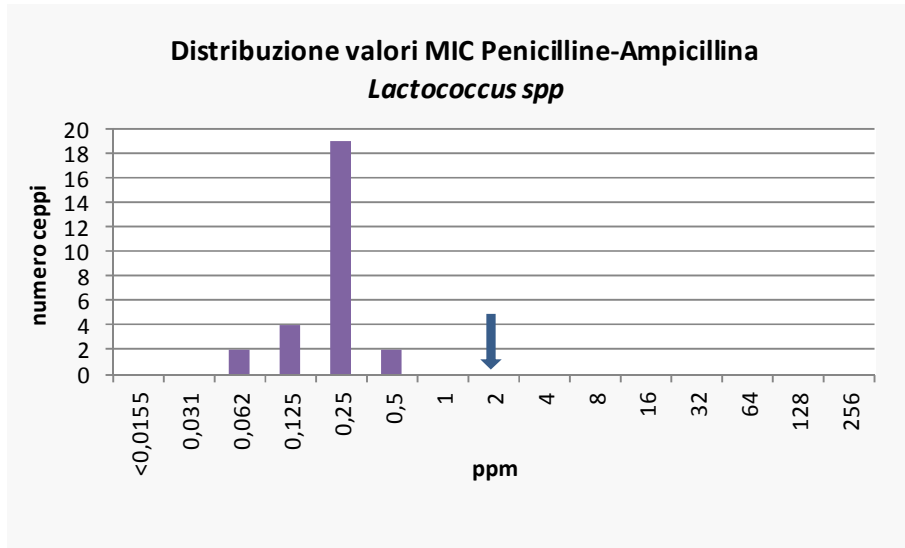
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.2: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per ampicillina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.3: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per ampicillina

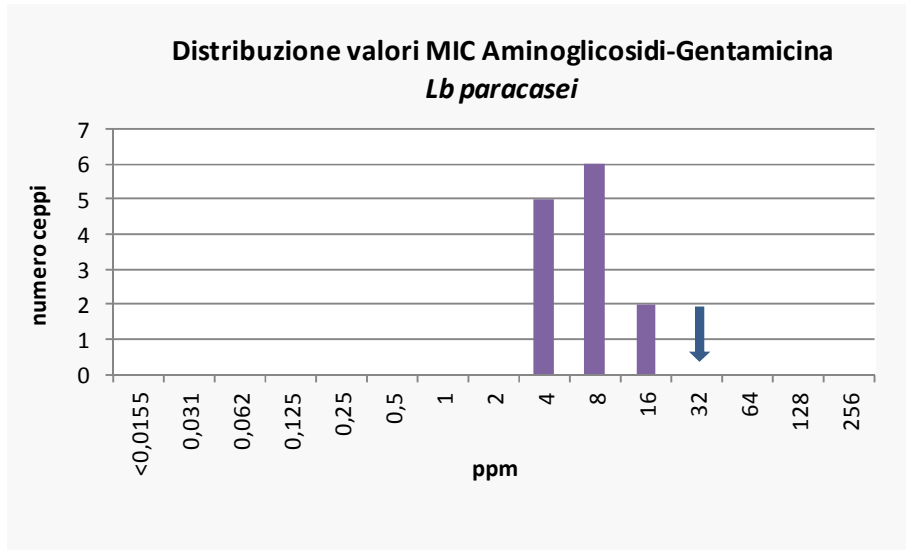


La freccia indica il valore di *cut off*

La distribuzione dei valori di M.I.C. per ampicillina è risultata essere unimodale, sia per il genere *Lactococcus* che per il genere *Lactobacillus*. I ceppi si sono distribuiti sotto i livelli di *cut off* EFSA (4 ppm per *Lb. paracasei* e 2 ppm per *Lb. plantarum* e *Lc. lactis*). Solamente due ceppi appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum* si sono collocati in corrispondenza del valore limite per la resistenza.

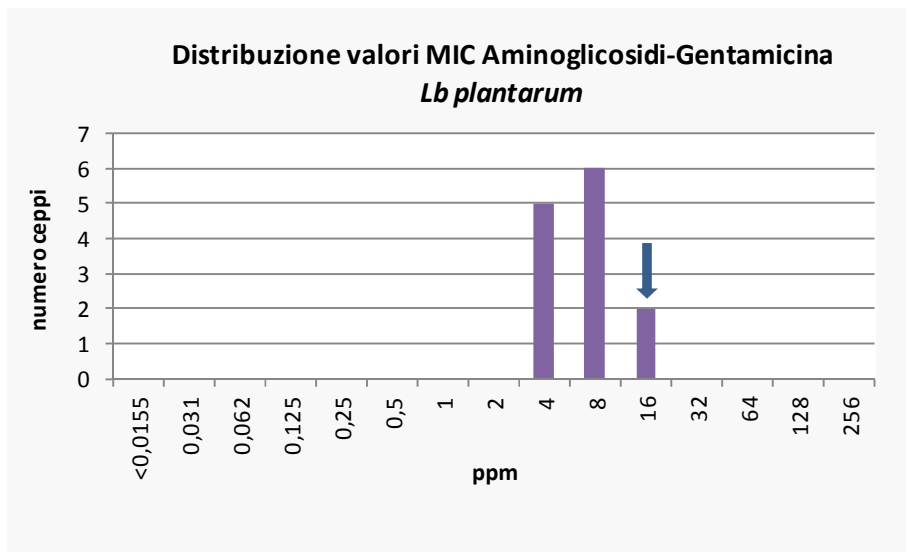
I risultati confermano quanto riportato in letteratura in merito alla sensibilità di lattobacilli e lattococchi nei confronti degli inibitori della sintesi della parete batterica, quali le penicilline (piperacillina e ampicillina) ed in generale i β -lattamici (Coppola *et. al*, 2005; Danielsen e Wind, 2003).

Graf.4: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per gentamicina



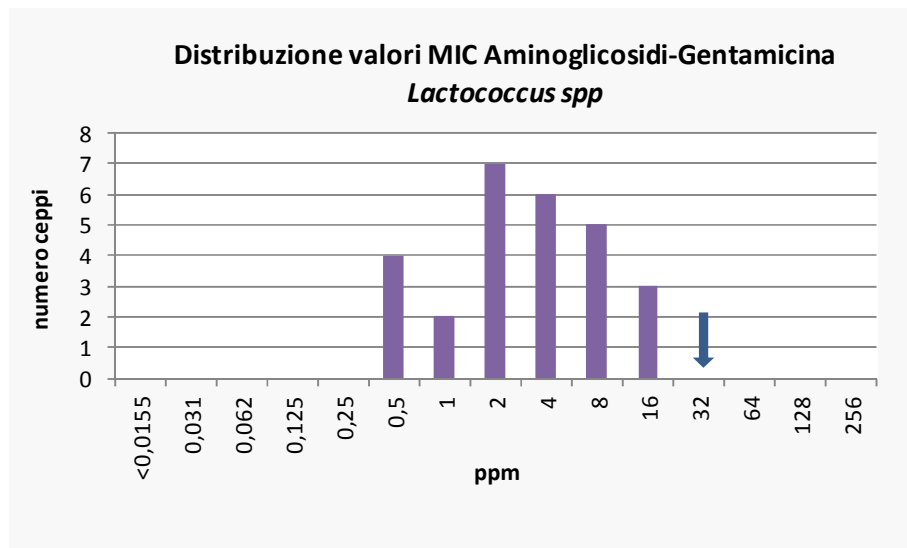
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.5: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* spp per gentamicina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.6: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per gentamicina

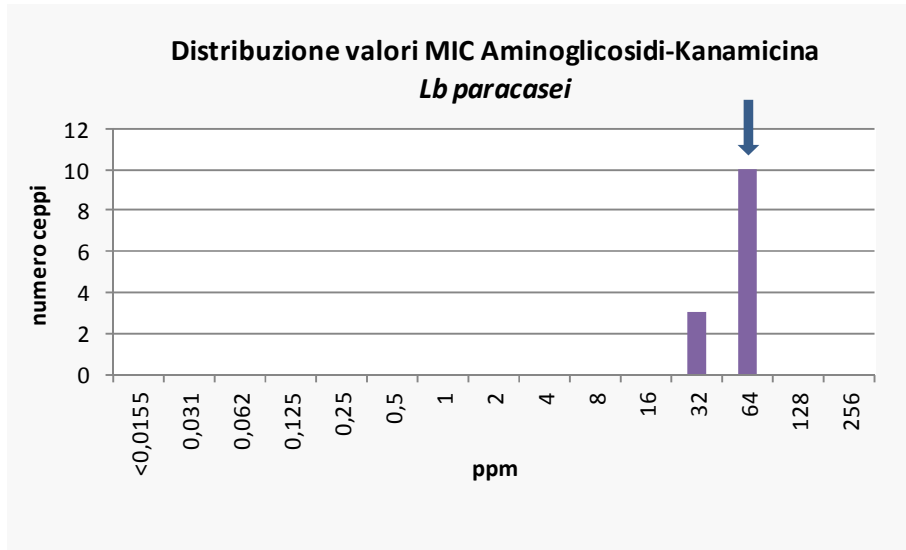


La freccia indica il valore di *cut off*

Anche nel caso di gentamicina, la distribuzione dei valori di M.I.C. rilevata è risultata essere unimodale sia per *Lactobacillus* spp che per *Lactococcus* spp. Il valore più rappresentato, ossia la moda, per *Lb. paracasei* e per *Lb. plantarum* è stato 8 ppm. Per *Lc. lactis* il range di distribuzione dei valori di M.I.C. è stato ampio (da 0,5 ppm a 16 ppm) con una lieve prevalenza del valore di 2 ppm.

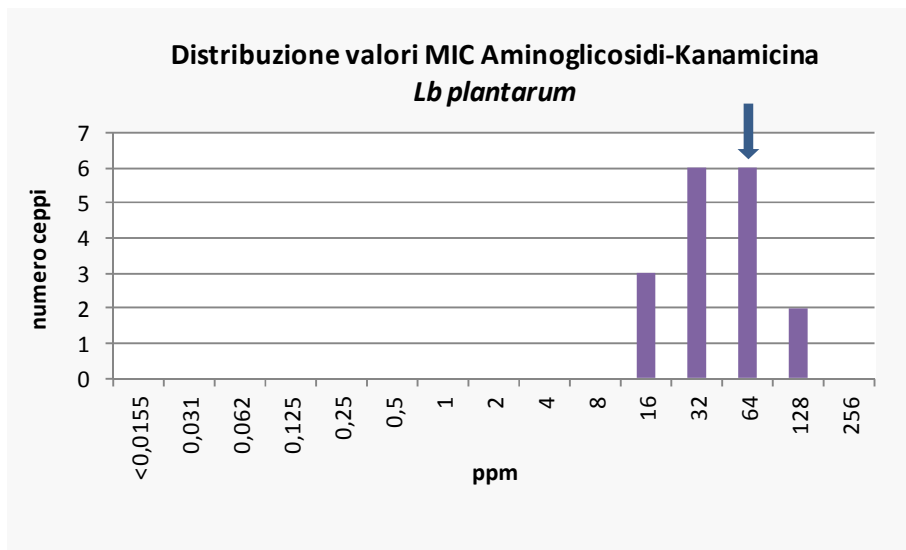
Non è stata messa quindi in evidenza nessuna resistenza nei confronti di questo antibiotico, seppure siano presenti in letteratura articoli che sottolineano percentuali di resistenza non trascurabili di lattobacilli e lattococchi nei confronti degli aminoglicosidi, tra cui la gentamicina. Il dato da noi riscontrato è comunque in accordo con quanto emerso in uno studio condotto nel 2003 da Danielsen e Wind, i quali avevano osservato valori di M.I.C. relativi a gentamicina tendenzialmente più bassi rispetto a quelli relativi ad altri aminoglicosidi, quali streptomina e kanamicina (range di M.I.C. osservati per gentamicina da 8 ppm a 64 ppm per *Lb. plantarum* e da 2 ppm a 64 ppm per *Lb. paracasei*).

Graf.7: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per kanamicina



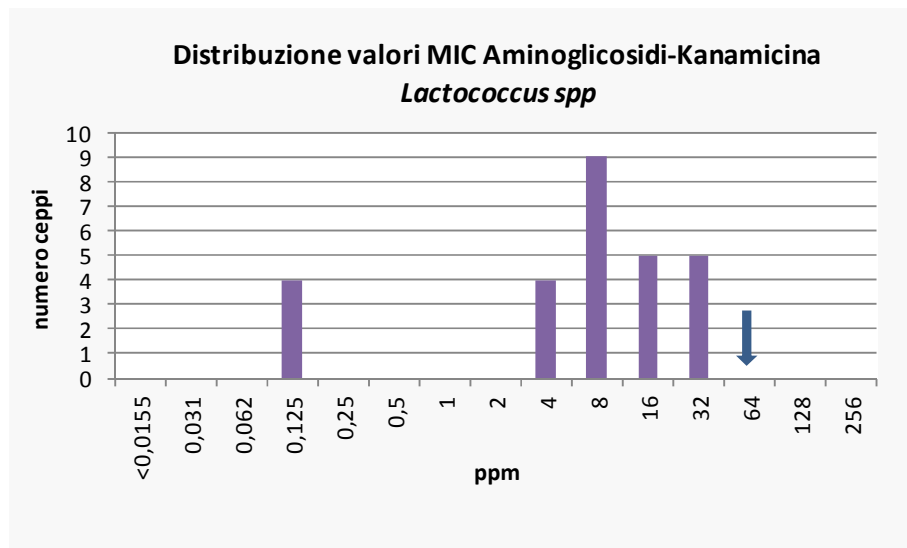
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.8: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per kanamicina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.9: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* per kanamicina



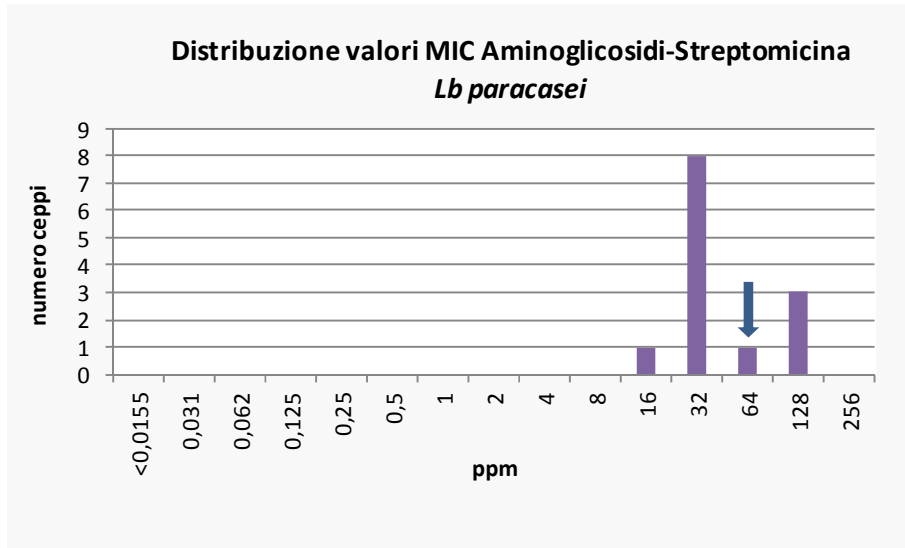
La freccia indica il valore di *cut off*

Per quanto riguarda la kanamicina, relativamente al genere *Lactobacillus* si osserva una distribuzione unimodale con *range* di distribuzione abbastanza ristretti sia per *Lb. paracasei* che per *Lb. plantarum*. Due ceppi hanno presentato un valore di M.I.C. pari a 128 ppm e quindi al di sopra del *cut off* EFSA (64 ppm). Questi ceppi erano entrambi appartenenti alla specie *Lb. plantarum* e provenienti dal Pecorino delle Colline Senesi.

Per quanto riguarda la specie *Lc. lactis* la totalità della popolazione si è distribuita all'interno di un *range* di valori compresi tra 4 ppm e 32 ppm, al di sotto della soglia di resistenza stabilita dall'EFSA. E' stato comunque possibile osservare il particolare comportamento di 4 ceppi che hanno presentato un valore di M.I.C. notevolmente più basso (0,125 ppm) rispetto alla restante popolazione. Questi tre ceppi erano tutti riconducibili alla subsp. *cremoris* ed erano stati isolati dallo stesso prodotto, il Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli.

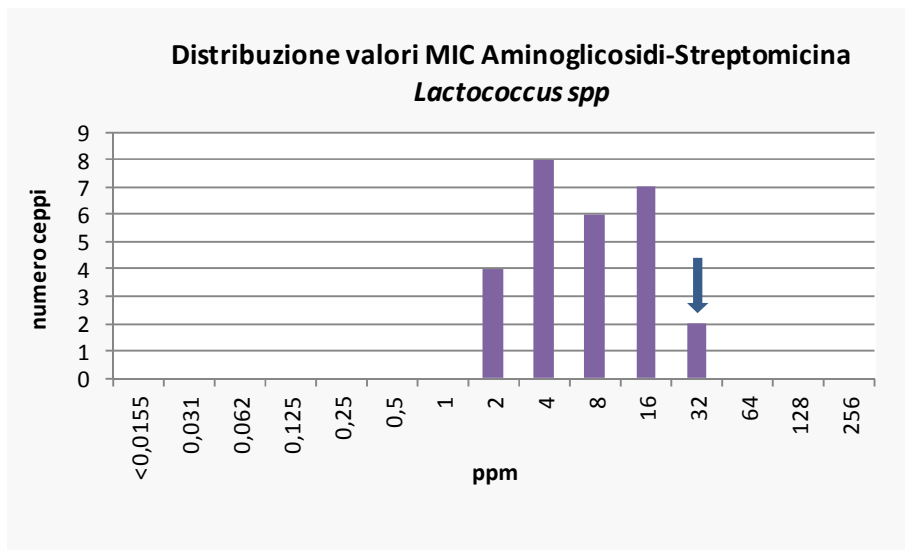
Per quanto riguarda *Lactobacillus spp* è stato messo in evidenza un elevato tasso di mutazioni spontanee nei confronti di kanamicina e streptomina (Curragh *et al.*, 1992). Questo si riflette anche nei valori di *cut off* stabiliti dall'EFSA per kanamicina (64 ppm, per *Lactococcus lactis*, *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*), che sono tra i più elevati tra tutti quelli considerati. Questo al fine di ottimizzare una eventuale ricerca di geni di resistenza.

Graf.10: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per streptomicina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.11: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per streptomicina

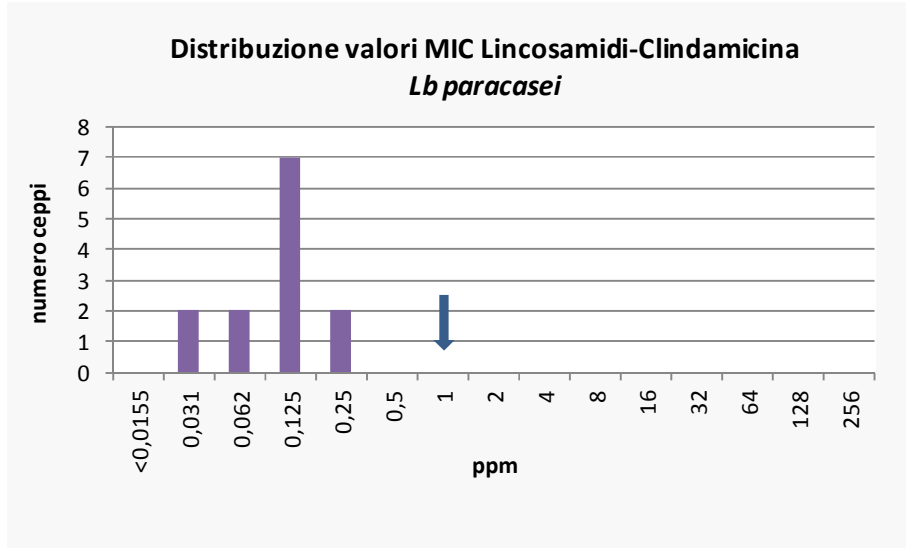


La freccia indica il valore di *cut off*

Per streptomicina è stato possibile osservare una distribuzione unimodale sia per *Lb. paracasei* che per *Lactococcus* spp. Fino al 2012 l'EFSA non prevedeva la determinazione del valore di M.I.C né per *Lactobacillus plantarum*, né per *Lb. paracasei*. L'aggiornamento del 2012 però ha introdotto la determinazione del valore di M.I.C. relativamente alla specie *Lb. paracasei* nei confronti di streptomicina. Questo probabilmente alla luce di alcuni recenti articoli che hanno messo in evidenza la presenza in *Lb. paracasei* di geni codificanti la resistenza situati su elementi genetici mobili, come ad esempio i geni *strA*, *strB*, *aadA* e *aadE* (Ouoba *et al.*, 2008). Per quanto riguarda *Lb. paracasei*, tre ceppi isolati dal Pecorino della Lunigiana sono risultati essere resistenti con un valore di M.I.C. pari a 128 ppm, superiore al *cut off* EFSA stabilito (64

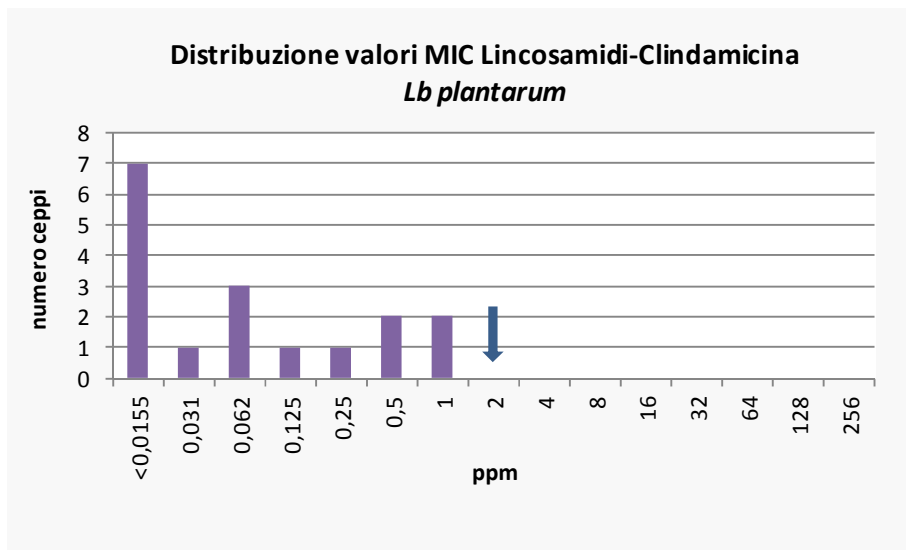
ppm). Per quanto riguarda *Lactococcus* spp solo due ceppi appartenenti alla sottospecie *lactis* e sempre provenienti dal Pecorino della Lunigiana si sono posizionati in corrispondenza del *cut off* EFSA.

Graf.12: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per clindamicina



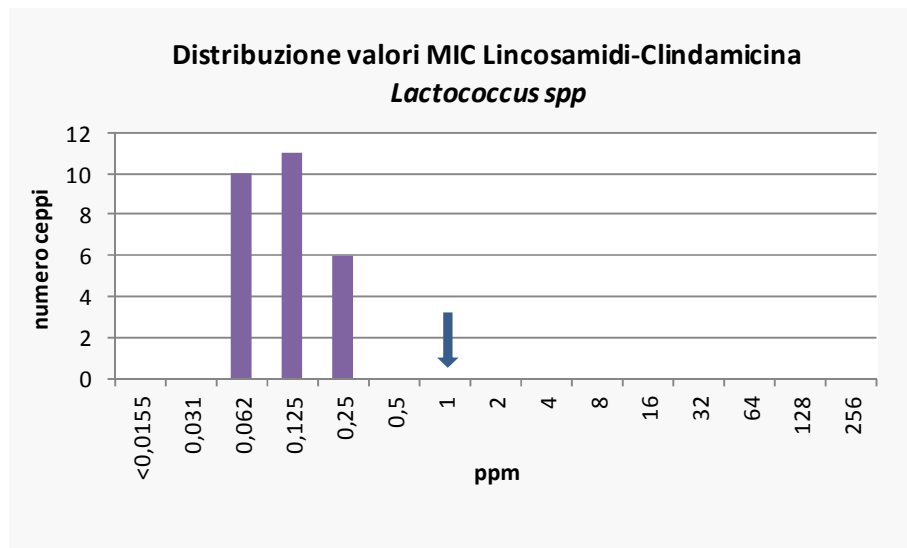
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.13: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per clindamicina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.14: Distribuzione valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp clindamicina

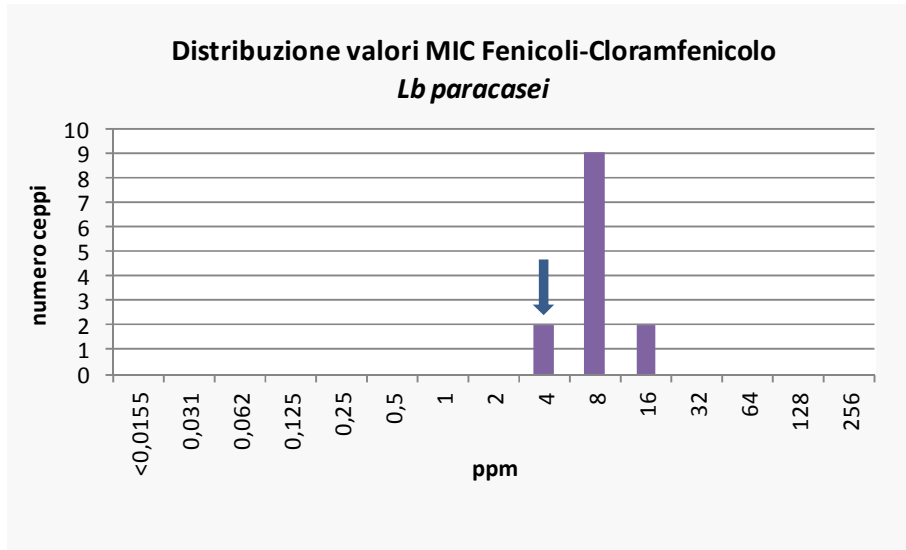


La freccia indica il valore di *cut off*

Per clindamicina è stato possibile osservare una distribuzione unimodale sia per *Lactobacillus* spp che per *Lactococcus* spp, con la maggior parte dei ceppi caratterizzati da M.I.C. abbondantemente al di sotto dei valori di *cut off* stabiliti dall'EFSA, peraltro molto bassi. Per tutti i ceppi, i valori maggiormente rappresentati sono stati inferiori a 0,5 ppm, ad indicare l'estrema sensibilità nei confronti di clindamicina: per *Lb. paracasei* il valore più rappresentato è stato 0,125 ppm, per *Lb. plantarum* <math><0,0155</math> ppm e per *Lc. lactis* 0,125 ppm. La specie che ha presentato ceppi con valori di M.I.C. più elevati (1 ppm) è stata *Lb. plantarum*.

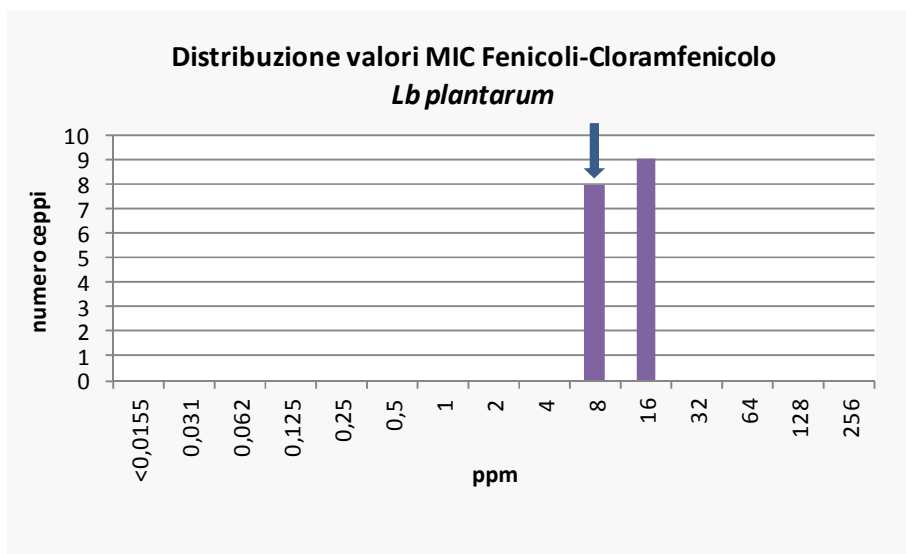
Sono presenti in letteratura diversi articoli che attestano la scarsa resistenza delle flore lattiche nei confronti degli inibitori della sintesi proteica, tra cui i lincosamidi (Ammor *et al.*, 2007; Klare *et al.*, 2007). Inoltre ad oggi sono pochi gli studi in bibliografia che hanno evidenziato nei LAB la presenza di specifici geni codificanti la resistenza verso clindamicina, situati su elementi genetici mobili, tuttavia il rischio non deve essere escluso a priori, poiché i geni *linB* e *Inu(A)* codificanti la resistenza ai lincosamidi sono stati messi in evidenza rispettivamente in *Enterococcus faecium* e *Lb. reuteri* (Bozdogan *et al.*, 1998; Rosander *et al.*, 2008).

Graf.15: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per cloramfenicolo



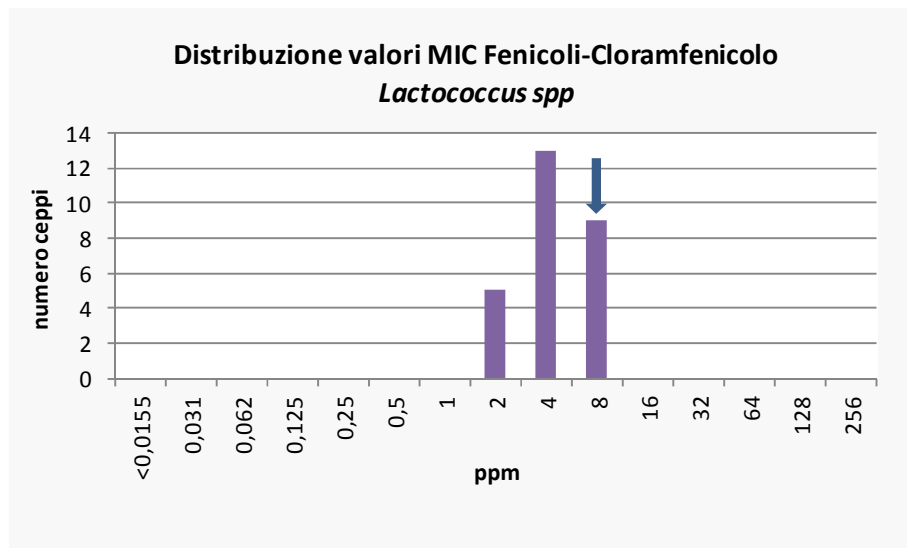
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.16: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per cloramfenicolo



La freccia indica il valore di *cut off*

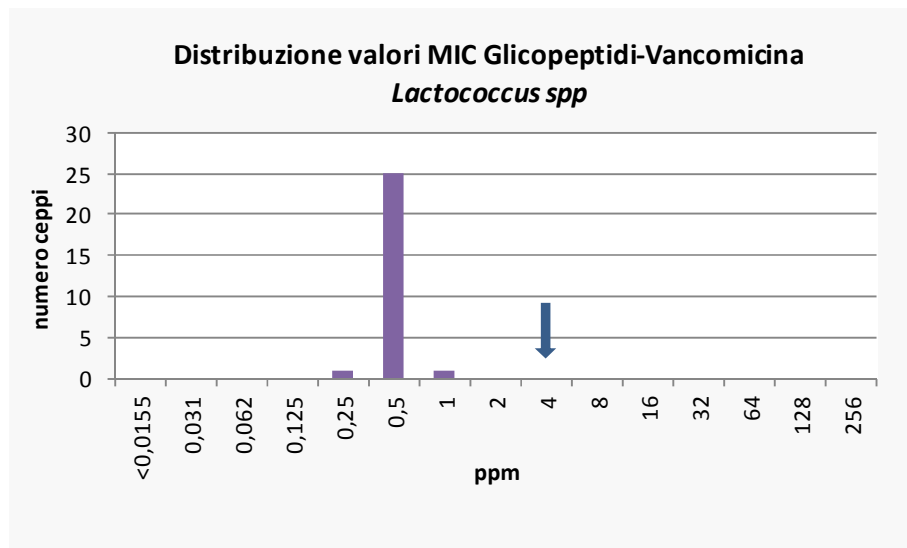
Graf.17: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per cloramfenicolo



La freccia indica il valore di *cut off*

Nonostante le distribuzioni unimodali osservate, per il genere *Lactobacillus* è stato possibile rilevare un consistente numero di ceppi con valori di M.I.C. relativi a cloramfenicolo al di sopra dei valori di *cut off* EFSA, nello specifico 11 ceppi appartenenti alla specie *Lb. paracasei* e 9 ceppi appartenenti alla specie *Lb. plantarum*. I valori di M.I.C. erano pari a 8 ppm (9 ceppi) e 16 ppm (2 ceppi) per *Lb. paracasei* e 16 ppm per tutti i ceppi resistenti della specie *Lb. plantarum*. Per il genere *Lactococcus* è stato possibile osservare una distribuzione unimodale, alcuni ceppi hanno mostrato valori di M.I.C. in corrispondenza del valore limite di resistenza stabilito (8 ppm), ma essi sono comunque risultati essere sensibili. I batteri lattici risultano generalmente sensibili ai fenicoli, che impediscono la sintesi proteica (Ammor *et al.*, 2007), tuttavia sono stati evidenziati da diversi autori geni codificanti resistenze acquisite per il cloramfenicolo, quali il gene *cat* ed *cat*_{P1501} (Hummel *et al.*, 2007, Aarestrup *et al.*, 2000). Nel caso del gene *cat* addirittura è stato possibile metterne in evidenza la presenza, senza che questo fosse fenotipicamente espresso.

Graf.18: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per vancomicina

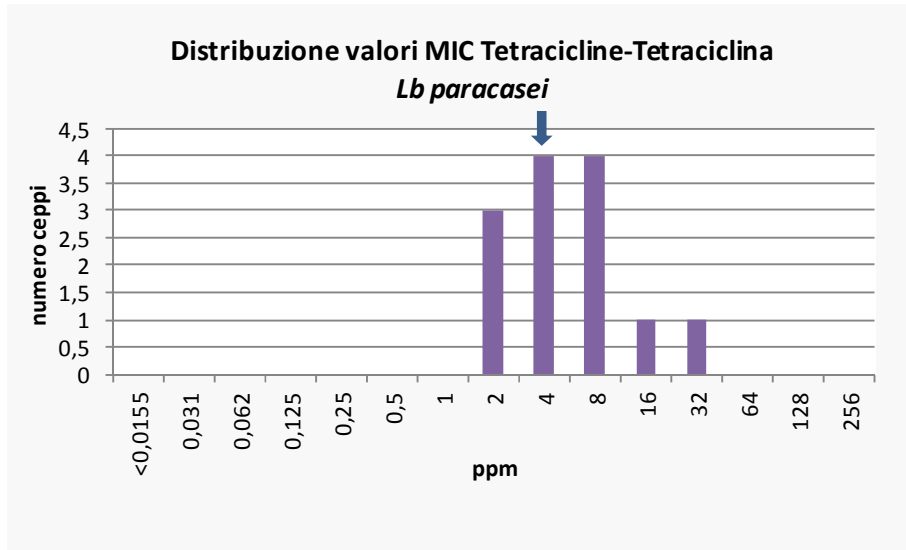


La freccia indica il valore di *cut off*

Le linee guida EFSA prevedono la valutazione della resistenza nei confronti di vancomicina solo per il genere *Lactococcus*, poiché molte specie di *Lactobacillus*, in particolar modo quelle eterofermentanti facoltative (*Lb. plantarum*, *Lb. casei/paracasei*) e anche alcune omofermentanti (*Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*), così come *Pediococcus* spp e *Leuconostoc* spp, sono intrinsecamente resistenti a questo antibiotico. Tale resistenza è dovuta a alla presenza della D-alanina-D-lattato nel peptidoglicano, anziché del dipeptide D-alanina-D-alanina (Klein *et al.*, 2000).

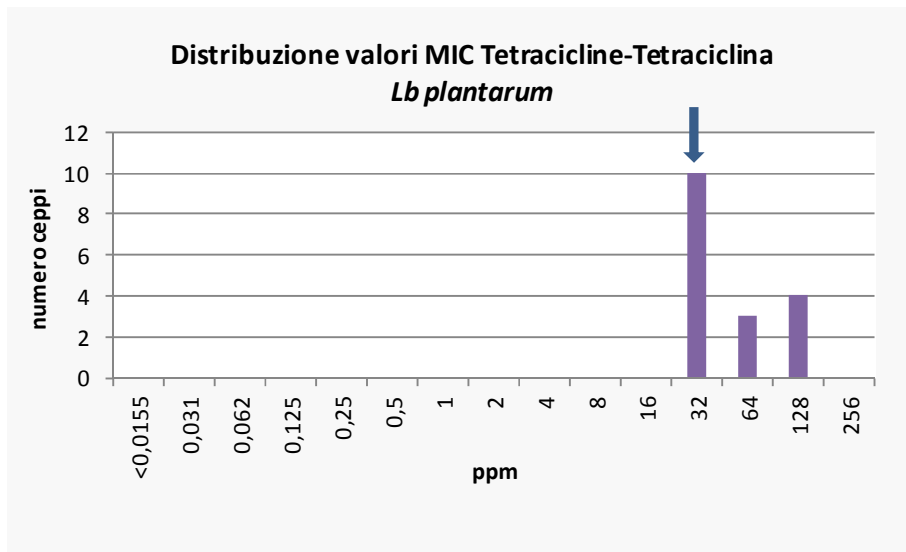
Per i ceppi analizzati è stata rilevata una distribuzione unimodale, la quasi totalità di essi (25 su 27 ceppi) ha infatti presentato lo stesso valore di M.I.C., pari a 0,5 ppm, ampiamente sotto il *cut off* EFSA. Questo dato è in accordo con la letteratura che vede *Lactococcus* spp sensibile anche a basse concentrazioni di vancomicina con frequenti valori di M.I.C. inferiori alle 2 ppm (Delgado *et al.*, 2005; Florez *et al.*, 2005; Danielsen e Wind, 2003).

Graf.19: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per tetraciclina



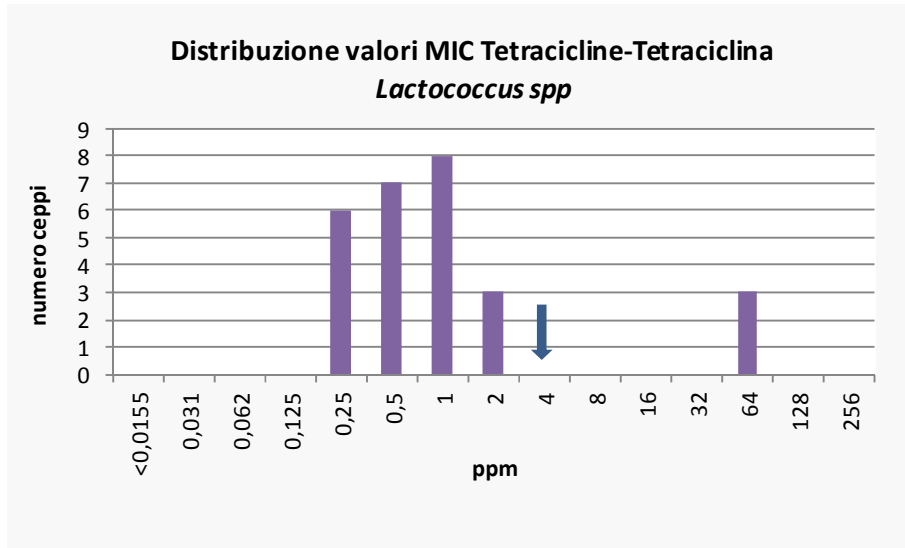
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.20: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per tetraciclina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.21: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per tetraciclina



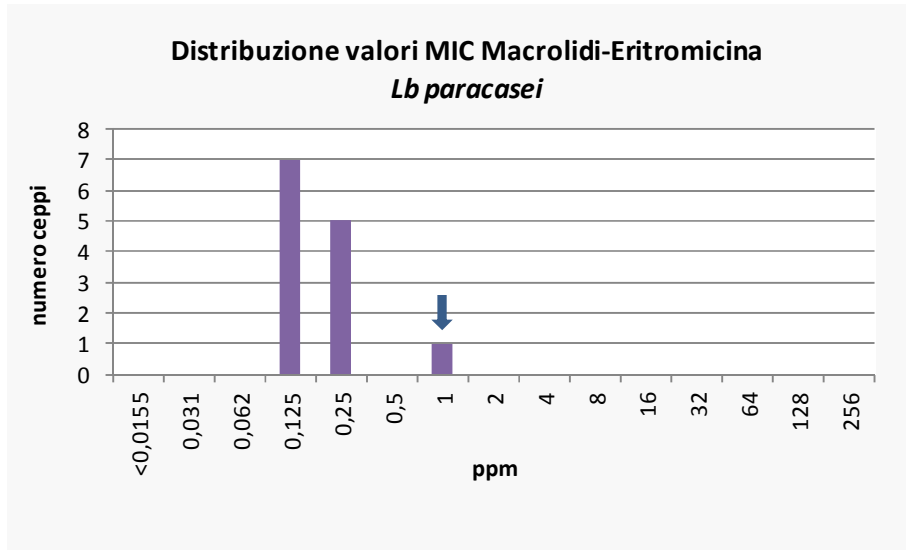
La freccia indica il valore di *cut off*

E' possibile notare immediatamente come la tetraciclina abbia il più ampio *range* di M.I.C. fino ad ora osservato, con valori di M.I.C. minimi pari a 0,25 ppm e valori massimi di 128 ppm. Per *Lactobacillus* spp è stato riscontrato un andamento unimodale, sia per *Lb. paracasei* che per *Lb. plantarum*. Alcuni ceppi hanno mostrato valori al di sopra del *cut off* EFSA: 6 appartenenti alla specie *Lb. paracasei* e 7 appartenenti alla specie *Lb. plantarum*. I ceppi resistenti di *Lb. paracasei* hanno presentato valori di M.I.C. per tetraciclina compresi tra 8 ppm e 32 ppm, dove 8 ppm è stato il valore più rappresentato. Per *Lb. plantarum* invece sono stati registrati valori di resistenza pari a 64 ppm e 128 ppm.

Per *Lactococcus* spp è stato possibile osservare una piccola percentuale di ceppi con valori di M.I.C. chiaramente distinti dal resto della popolazione studiata. La maggior parte della popolazione si è infatti distribuita all'interno di un *range* di valori compreso tra 0,25 ppm e 2 ppm, al di sotto del *cut off* EFSA (4 ppm). Al contrario tre ceppi appartenenti alla subsp. *cremoris* ed isolati dal Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli hanno presentato un valore di M.I.C. pari a 64 ppm, notevolmente al di sopra del *cut off* indicato.

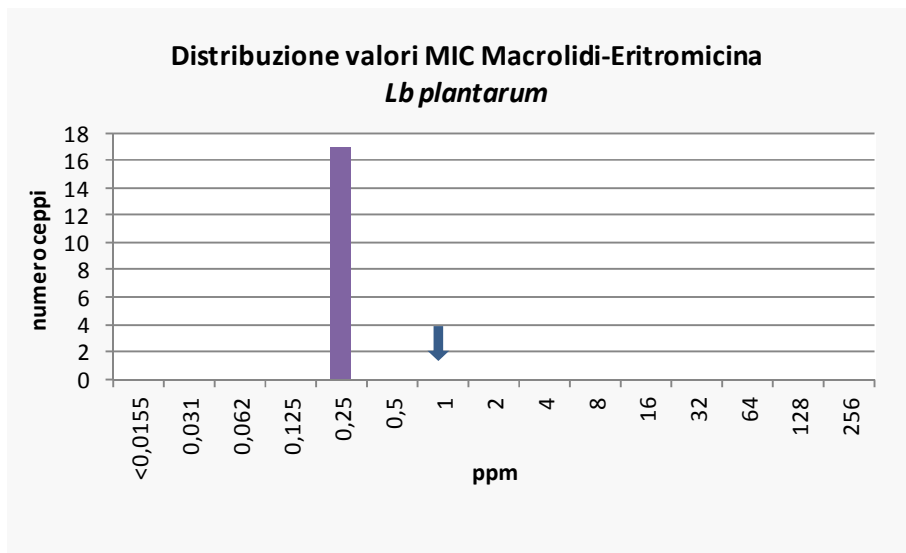
La bibliografia in merito alla resistenza delle flore lattiche nei confronti di tetraciclina è assai ampia. Generalmente i batteri lattici risultano avere un comportamento variabile nei confronti delle tetraciclina: così come per *Lactobacillus* spp, singoli ceppi di *Lc. lactis* sono risultati essere resistenti nei confronti di tetraciclina (Florez *et al.*, 2005; Temmerman *et al.*, 2003; Raha *et al.*, 2002) e sono stati identificati molteplici geni codificanti tale resistenza. I più diffusi tra i batteri lattici fino ad oggi sono i geni *tet(K, M, O, Q, S, W, L, 36)* (Comunian *et al.*, 2010; Huys *et al.*, 2006; Roberts, 2005; Villedieu *et al.*, 2003; Chopra e Roberts, 2001).

Graf.22: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus paracasei* per eritromicina



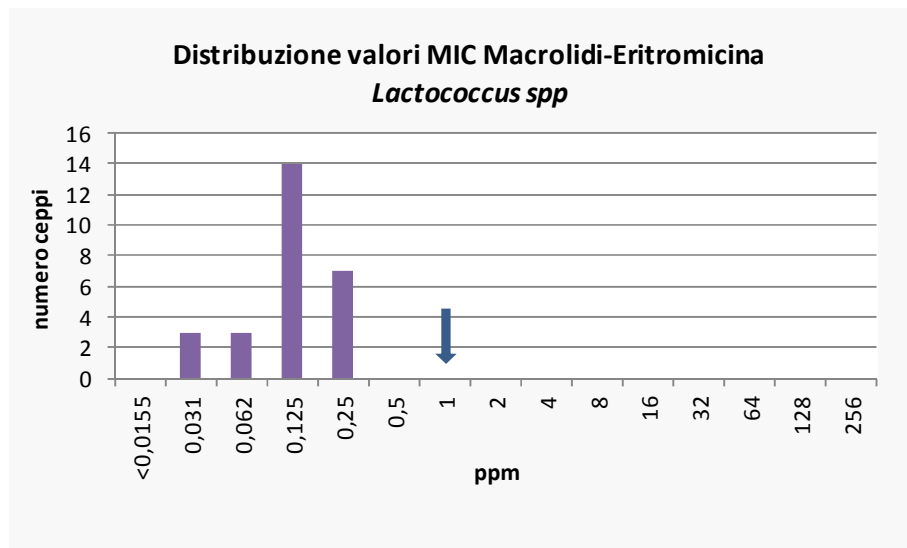
La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.23: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactobacillus plantarum* per eritromicina



La freccia indica il valore di *cut off*

Graf.24: Distribuzione dei valori di M.I.C. relativi a *Lactococcus* spp per eritromicina



La freccia indica il valore di *cut off*

La distribuzione dei valori di M.I.C. osservata è stata unimodale nel caso di *Lb. plantarum* e *Lactococcus* spp, con la totalità della popolazione che presentava valori di M.I.C. nei confronti di eritromicina ben al di sotto del *cut off* EFSA. Per *Lb. paracasei*, invece, si è potuto osservare un ceppo avente un valore di M.I.C. pari a 1 ppm, che si discostava dal resto della popolazione, che invece presentava valori di M.I.C. distribuiti tra 0,125 ppm e 0,25 ppm. Questo unico ceppo, isolato dal Pecorino della Montagna Pistoiese, si collocava tuttavia all'interno del *range* di sensibilità secondo i parametri stabiliti dall'EFSA.

La bibliografia disponibile ad oggi vede i batteri lattici come microrganismi generalmente suscettibili nei confronti di eritromicina, quale inibitore della sintesi proteica. Sono stati comunque identificati in molte specie determinanti genetici, quali il gene *erm*, che conferiscono resistenza fenotipica verso eritromicina (Cataloluk e Gogebakan, 2004; Fons *et al.*, 1997; Tannock *et al.*, 1994). Tuttavia i ceppi che presentano tali geni mostrano solitamente livelli di resistenza fenotipica molto elevati, con valori di M.I.C. ben al di sopra dei *cut off*, come riportato ad esempio in un articolo di Comunian *et al.* del 2010: i ceppi di *Lb. paracasei* alberganti il gene *ermB* mostravano infatti valori di M.I.C. > 1024 ppm.

9.1.3 Confronto tra i due metodi utilizzati per la valutazione della resistenza fenotipica verso gli antibiotici

Nella Tabella 16 sono state messe a confronto le percentuali di fenotipi resistenti riscontrati per *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp con i due metodi utilizzati: diffusione su agar e microdiluizioni.

Tab.16: Confronto tra le percentuali di resistenza osservate per *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp con il metodo di diffusione su agar ed il metodo delle microdiluizioni

Antibiotici	<i>Lactobacillus</i> spp		<i>Lactococcus</i> spp	
	R (%) diffusione agar	R (%) microdiluizioni	R(%) diffusione agar	R(%) microdiluizioni
Tetraciclina	0	46,67	7,40	11,12
Eritromicina	0	0	0	0
Ampicillina	0	0	0	0
Gentamicina	0	0	0	0
Kanamicina	73,33	6,67	3,70	0
Clindamicina	0	0	0	0
Cloramfenicolo	0	66,67	0	0
Vancomicina	nd	nd	0	0
Streptomina	38,46	23,07	40,75	0

nd: non determinato

La Tabella 16 mette in evidenza come i due metodi fenotipici utilizzati differiscano in modo sostanziale per quanto riguarda i risultati forniti, relativamente a tetraciclina, kanamicina, cloramfenicolo, soprattutto per il genere *Lactobacillus*, e streptomina, in particolar modo per il genere *Lactococcus*. Per tetraciclina e cloramfenicolo l'interpretazione dei risultati ottenuti con il metodo delle microdiluizioni per il genere *Lactobacillus* fornisce una percentuale più elevata di ceppi resistenti, rispetto a quanto osservato con il metodo di diffusione su agar. Per kanamicina si osserva invece la situazione contraria. Relativamente al genere *Lactococcus* la discrepanza maggiore tra i due metodi si osserva nei confronti di streptomina, per la quale il metodo di diffusione su agar fornisce una percentuale di ceppi resistenti, che non è stata invece rilevata mediante il metodo delle microdiluizioni.

Il confronto dei risultati relativi all'antibiotico-resistenza e derivanti dai due diversi metodi è risultato quindi difficoltoso.

Le discrepanze rilevate potrebbero essere giustificabili considerando che i riferimenti forniti da Charteris *et al.* (1998) per l'interpretazione dei diametri degli aloni di inibizione sono stati determinati prendendo come standard interpretativi alcuni riferimenti originariamente designati per campioni clinici. Nella ricerca di Charteris *et al.* viene inoltre utilizzato MRS agar quale terreno colturale per i test. Huys *et al.* nel 2002 hanno poi sottolineato come questo terreno, sebbene in grado di supportare in maniera ottimale lo sviluppo di lattobacilli e lattococchi, interagisca con alcuni principi attivi utilizzati nei test di diffusione su agar (ampicillina e tetraciclina), fornendo diametri degli aloni diversi da quelli ottenuti usando altri mezzi colturali, quali, ad esempio, Iso-sensitest agar. Successivamente lo stesso gruppo di ricerca ha messo a punto un nuovo terreno, denominato *Lactic acid bacteria Susceptibility Medium* (LSM), costituito per il 90% da Isosensitest e per il restante 10% da MRS, che permette di soddisfare gli esigenti fabbisogni nutritivi dei batteri lattici ed al tempo stesso di evitare l'interazione con i principi attivi utilizzati nei test (Klare *et al.*, 2005).

Nella valutazione dei dati ottenuti mediante il metodo di diffusione su agar è inoltre doveroso considerare che i riferimenti utilizzati per l'interpretazione degli aloni di inibizione, proposti da Charteris *et al.*, sono relativi a specie del genere *Lactobacillus*, quali *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*. Tali riferimenti restano ad oggi gli unici disponibili in bibliografia e sono stati utilizzati recentemente da alcuni autori per l'interpretazione del diametro degli aloni di inibizione relativi a batteri lattici non appartenenti al genere *Lactobacillus* (Belletti *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009).

Se per il metodo di diffusione su agar vi sono riferimenti utilizzati per microrganismi appartenenti a diversi generi (*Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp.), l'EFSA fornisce *cut off* diversi per l'interpretazione dei valori di M.I.C., non solo per quanto riguarda i diversi generi appartenenti al gruppo dei batteri lattici, ma, in alcuni casi, anche per le diverse specie appartenenti allo stesso genere. Relativamente a *Lactobacillus* spp sono ad esempio forniti *cut off* diversi per *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*.

Ad oggi quindi non esistono riferimenti ufficiali per il metodo di diffusione su agar che tengano conto delle specifiche caratteristiche delle varie specie di *Lactobacillus* spp o addirittura di generi diversi, quali *Lactococcus*.

Sarebbe ad ogni modo auspicabile avere a disposizione un metodo di *screening* veloce ed economico, quale il metodo di diffusione su agar, al fine di valutare la necessità di sottoporre i ceppi ad indagini più accurate, come la determinazione del valore di M.I.C. Questo sarà possibile solamente quando verranno stabiliti adeguati riferimenti per l'interpretazione dei dati ottenuti.

9.1.4 Ricerca dei geni codificanti la resistenza agli antibiotici

La ricerca dei geni codificanti resistenze agli antibiotici è stata effettuata esclusivamente per i ceppi con un valore di M.I.C. superiore al *cut off* EFSA e quindi classificati come resistenti. Nello specifico, sono stati testati 13 lattobacilli e 3 lattococchi per la presenza dei geni di resistenza alla tetraciclina; 20 lattobacilli per la presenza dei geni di resistenza al cloramfenicolo e 3 lattobacilli per la presenza dei geni di resistenza alla streptomina. Non sono stati ricercati i geni di resistenza alla kanamicina nei due lattobacilli classificati come resistenti, poiché sono presenti in bibliografia numerosi articoli che attestano la natura intrinseca di questa resistenza.

In proposito è interessante una ricerca di Charteris *et al.* del 2000: in questo lavoro si descrive la perdita della resistenza agli aminoglicosidi da parte di alcuni lattobacilli investigati, in presenza di sali biliari deconiugati, quali ad esempio l'acido colico. Questa molecola infatti favorirebbe la permeabilizzazione della parete cellulare agli aminoglicosidi. La resistenza verso questa categoria di antimicrobici sarebbe quindi intrinseca e dovuta ad un'impermeabilità della parete, probabilmente anche affiancata da un potenziato meccanismo di efflusso (Elkins e Mullis, 2004).

Gli unici ceppi che hanno rivelato la presenza di geni codificanti resistenza sono stati Lc17, Lc18, Lc20 (Tabella 17), tutti e tre appartenenti alla specie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ed isolati dal Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli. Tali ceppi sono risultati essere positivi per *tet(M-O)* e per *tet(M)* (Figura 19). Essi, a differenza di tutti gli altri testati per la ricerca dei geni codificanti resistenze, avevano presentato valori di M.I.C. che si discostavano nettamente da quelli del resto della popolazione e che erano ben otto volte superiori al *cut off* EFSA (*cut off*: 4 ppm; M.I.C. 64 ppm).

Tab.17: Numero dei ceppi positivi per la ricerca di geni codificanti antibiotico-resistenza

Gene amplificato	Resistenza codificata	Riferimento bibliografico	Numero ceppi positivi	
			<i>Lactococcus</i> spp	<i>Lactobacillus</i> spp
<i>tet(W)</i>	tetraciclina	Aminov <i>et al.</i> , 2001	0	0
<i>tet(L)</i>	tetraciclina	Gevers <i>et al.</i> , 2003	0	0
<i>tet(S)</i>	tetraciclina	Aminov <i>et al.</i> , 2001	0	0
<i>tet(M-O)</i>	tetraciclina	Bartocci <i>et al.</i> , 2004	3	0
<i>tet(M)</i>	tetraciclina	Olsvik <i>et al.</i> , 1995	3	0
<i>cat</i>	cloramfenicolo	Hummel <i>et al.</i> , 2007	0	0
<i>catIP501</i>	cloramfenicolo	Aarestrup <i>et al.</i> , 2000	0	0
<i>strA</i>	streptomina	Ouoba <i>et al.</i> , 2008	0	0
<i>strB</i>	streptomina	Ouoba <i>et al.</i> , 2008	0	0

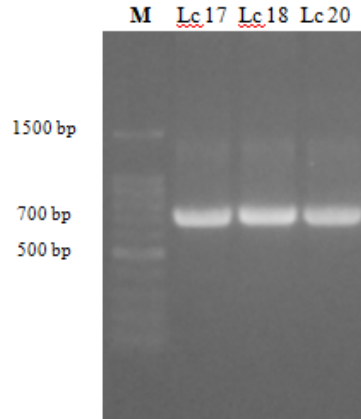


Fig.19: Corsa elettroforetica su gel di agarosio di amplificati ottenuti con primer specifici per il gene *tet(M)*. M: marker, dimensioni amplificato: 740 bp

A proposito di *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, vi sono alcuni studi recenti che vedono questa specie coinvolta in episodi di polmonite necrotizzante, ascessi a livello del fegato e del collo, anche in soggetti immunocompetenti (Buchelli-Ramirez *et al.*, 2013; Hadjisymeou *et al.*, 2013; Antolin *et al.*, 2004). Questo porterebbe a considerare la possibilità che alcuni ceppi di *Lc. lactis* subsp. *cremoris* si configurino come veri e propri patogeni.

Per la ricerca dei geni di resistenza, sono stati presi in considerazione solo i ceppi con valori di M.I.C. superiori ai *cut off* proposti dall'EFSA. Nonostante ciò il quadro che è emerso ha messo in evidenza una mancata ottimizzazione della ricerca molecolare. Ciò conduce nuovamente al problema che riguarda l'ottimizzazione dei valori interpretativi, rappresentati in questo caso dai *cut off* EFSA.

A questo proposito, Danielsen e Wind già nel 2003 proponevano di aumentare i valori di *cut off* indicati dall'EFSA per il genere *Lactobacillus* relativamente a molti antibiotici, tra cui tetraciclina, kanamicina e cloramfenicolo: nello specifico proponevano per *Lb. plantarum* un *cut off* di 64 ppm nei confronti di tetraciclina, mentre per *Lb. paracasei* il valore di *cut off* proposto (4 ppm) corrispondeva a quello suggerito dall'EFSA. Per quanto riguarda, invece, gli aminoglicosidi kanamicina e streptomina per il genere *Lactobacillus* era proposto un *cut off* >256 ppm, a testimonianza della natura intrinseca di questa resistenza. Per cloramfenicolo infine era proposto un *cut off* per *Lactobacillus* spp di 16 ppm. Valutando i valori di M.I.C. ottenuti mediante questi *cut off*, il numero dei lattobacilli considerati resistenti si andrebbe a ridurre notevolmente. Nello specifico, il numero di *Lb. plantarum* candidati per la ricerca dei geni di resistenza per tetraciclina si ridurrebbe a 4, mentre nessun ceppo sarebbe stato classificato come resistente per cloramfenicolo, streptomina e kanamicina. Conseguentemente nessun ceppo sarebbe stato sottoposto a ricerca dei geni codificanti resistenza nei confronti di questi tre antibiotici.

9.2 Caratterizzazione tecnologica dei ceppi

9.2.1 Valutazione dell'attività acidificante

Nelle Tabelle 18 e 19 sono riportati i risultati relativi all'attività acidificante rispettivamente di *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp.

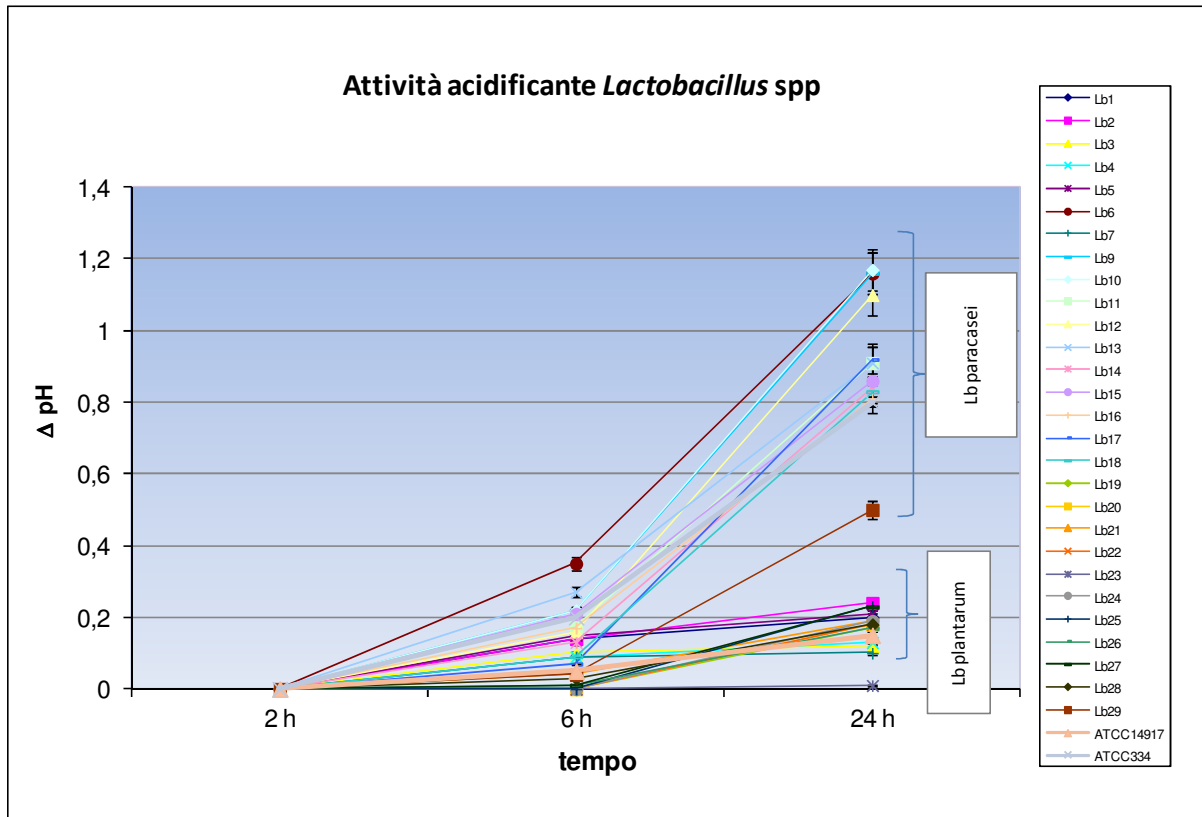
I Grafici 25 e 26 mostrano gli andamenti nel tempo delle attività acidificanti dei ceppi esaminati, suddivisi in base ai due generi *Lactobacillus* e *Lactococcus*.

Tab.18: Attività acidificante dei ceppi di *Lactobacillus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	Δ pH 2h	Δ pH 6h	Δ pH 24h
Lb1	PCS	<i>Lb plantarum</i>	0	0,14	0,2
Lb2	PCS	<i>Lb plantarum</i>	0	0,14	0,24
Lb3	PCS	<i>Lb plantarum</i>	0	0,10	0,12
Lb4	PCS	<i>Lb plantarum</i>	0	0,09	0,13
Lb5	PCS	<i>Lb plantarum</i>	0	0,15	0,21
Lb6	PCS	<i>Lb paracasei</i>	0	0,35	1,16
Lb7	PCS	<i>Lb paracasei</i>	0	0,09	0,1
Lb9	PMP	<i>Lb paracasei</i>	0	0,22	1,16
Lb10	PMP	<i>Lb paracasei</i>	0	0,22	1,17
Lb11	PMP	<i>Lb paracasei</i>	0	0,17	0,91
Lb12	PMP	<i>Lb paracasei</i>	0	0,16	1,1
Lb13	PMP	<i>Lb paracasei</i>	0	0,27	0,91
Lb14	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	0	0,13	0,84
Lb15	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	0	0,21	0,86
Lb16	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	0	0,17	0,81
Lb17	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	0	0,07	0,92
Lb18	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	0	0,09	0,83
Lb19	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,17
Lb20	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,18
Lb21	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	0	0,04	0,19
Lb22	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,18
Lb23	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,01
Lb24	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,19
Lb25	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0	0,23
Lb26	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0,01	0,17
Lb27	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0,01	0,23
Lb28	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0,03	0,18
Lb29	PL	<i>Lb plantarum</i>	0	0,04	0,50
ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>	0	0,05	0,15
ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>	0	0,20	0,80

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

Graf.25: Capacità acidificante di *Lactobacillus* spp



Dal Grafico 25 è possibile osservare come i ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* si suddividano in due gruppi dagli andamenti ben distinti. Questa suddivisione non è casuale, ma vede i ceppi raggrupparsi in base alle due specie studiate (*Lb. paracasei* e *Lb. plantarum*). Quello che accomuna i due gruppi è l'acidificazione praticamente nulla dopo due ore dall'inoculo nel latte. A partire dalle sei ore dopo l'inoculo si comincia invece a delineare la suddivisione nei due raggruppamenti. I ceppi con valori di Δ pH più elevati appartenevano alla specie *Lb. paracasei*, mentre quelli meno acidificanti appartenevano alla specie *Lb. plantarum*, ad eccezione di un ceppo (Lb7), che nonostante l'appartenenza alla specie *Lb. paracasei*, aveva un'acidificazione pressoché nulla. Dopo 24 ore dall'inoculo la divisione tra le due specie si è delineata ancora più nettamente: escludendo il ceppo Lb7, i ceppi di *Lb. paracasei* presentavano valori di Δ pH compresi tra un minimo di 0,63 ed un massimo di 1,17. I ceppi appartenenti alla specie *Lb. plantarum* presentavano invece dopo 24 ore valori di Δ pH compresi tra 0,01 e 0,5. I risultati ottenuti sono in accordo con Nieto-Arribas *et al.* (2009) e Xanthopoulos *et al.* (2000) che, indagando alcune caratteristiche tecnologiche di ceppi di *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*, hanno messo in evidenza una limitata capacità acidificante di queste specie.

Considerata la scarsa acidificazione prodotta, soprattutto dopo 2 ore dall'inoculo, si può quindi prevedere un utilizzo delle due specie considerate (*Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*) come colture secondarie, piuttosto che come colture primarie. In alternativa ceppi di *Lb. paracasei* e *Lb.*

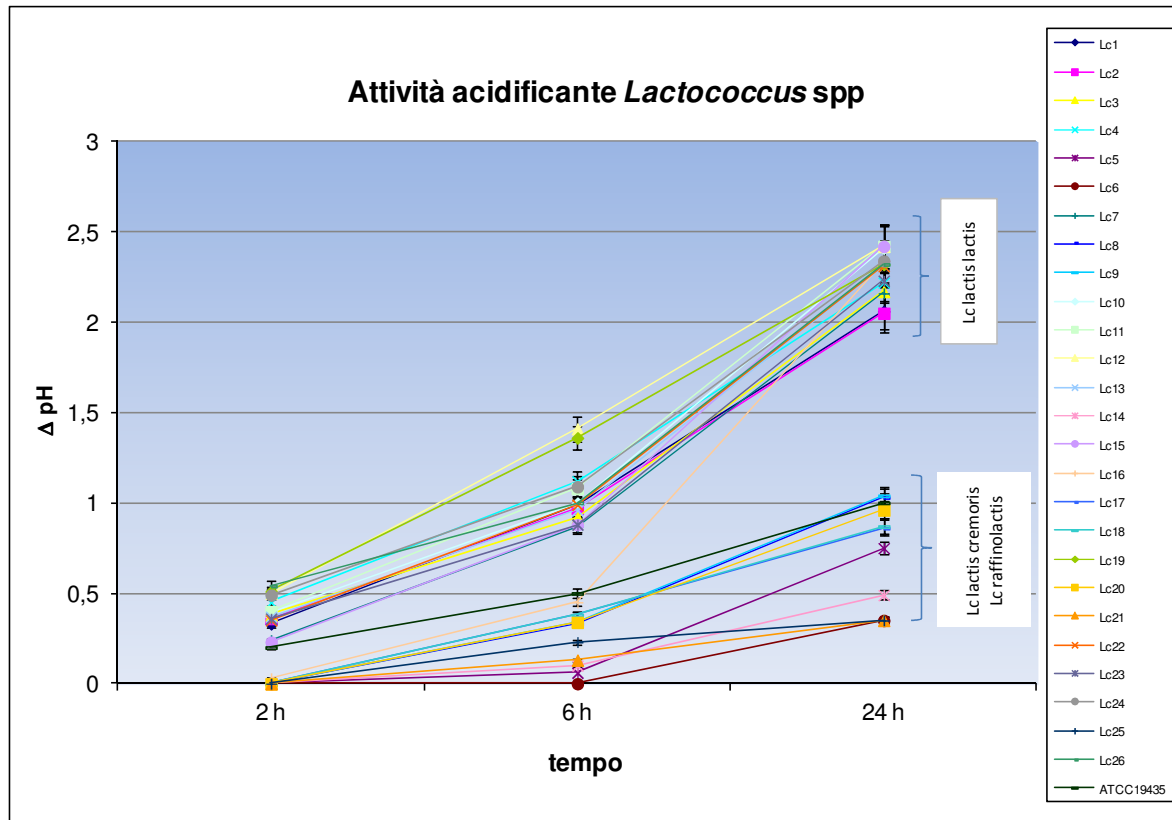
plantarum potrebbero essere impiegati in combinazione con ceppi appartenenti al genere *Lactococcus* o *Streptococcus* in modo da sopperire alla scarsa attività acidificante.

Tab.19: Attività acidificante dei ceppi di *Lactococcus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	Δ pH 2h	Δ pH 6h	Δ pH 24h
Lc1	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,33	0,99	2,06
Lc2	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,36	0,97	2,05
Lc3	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,38	0,92	2,17
Lc4	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,45	1,12	2,22
Lc5	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	0	0,06	0,75
Lc6	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	0	0	0,35
Lc7	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	0,24	0,87	2,16
Lc8	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	0	0,33	1,03
Lc9	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	0	0,34	1,04
Lc10	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	0,39	1	2,41
Lc11	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	0,4	1,08	2,42
Lc12	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	0,5	1,41	2,42
Lc13	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	0,37	0,96	2,31
Lc14	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	0	0,1	0,49
Lc15	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	0,23	0,88	2,42
Lc16	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	0,03	0,45	2,33
Lc17	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0	0,38	0,86
Lc18	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0	0,38	0,87
Lc19	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,51	1,36	2,32
Lc20	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0	0,34	0,96
Lc21	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	0	0,13	0,35
Lc22	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	0,35	0,99	2,31
Lc23	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	0,36	0,88	2,23
Lc24	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,49	1,09	2,34
Lc25	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	0	0,23	0,35
Lc26	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,54	1	2,32
ATCC 19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>	0,20	0,50	1

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

Graf.26: Andamento attività acidificante di *Lactococcus* spp



Anche per quanto riguarda il genere *Lactococcus* si denota una suddivisione dei ceppi in due gruppi abbastanza distinti. Un primo gruppo di ceppi ha presentato dopo 2 ore dall'inoculo un'acidificazione nulla, un secondo gruppo invece è stato in grado di acidificare il latte già dopo due ore dall'inoculo.

I ceppi con valori globalmente più bassi di acidificazione erano per la maggior parte appartenenti alla subspecie *cremoris* e alla specie *Lc. raffinolactis*. Tuttavia anche alcuni ceppi appartenenti alla subspecie *lactis* (Lc14, Lc21, Lc25) hanno presentato un'acidificazione nulla dopo 2 ore dall'inoculo; mentre i ceppi Lc19, Lc26, Lc24 appartenenti alla subsp. *cremoris* hanno mostrato un fenotipo *lactis*, raggiungendo valori di Δ pH a 24 ore di 2,32, 2,34 e 2,32 rispettivamente.

Quindi questa caratteristica sembra essere maggiormente legata al ceppo che alla specie o alla subspecie. L'andamento caratteristico dei singoli ceppi è comunque generalmente mantenuto: quelli maggiormente acidificanti dopo 2 ore, lo sono anche dopo 24 ore. Un solo ceppo (Lc16) ha invece presentato un repentino incremento dell'attività acidificante tra le 6 e le 24 ore.

I valori di acidificazione dopo 24 ore erano compresi tra 0,35 e 2,42. I ceppi appartenenti alla subspecie *lactis* sono stati quelli con i valori di acidificazione a 24 ore più elevati, tuttavia i tre ceppi appartenenti a questa stessa subspecie che hanno presentato un andamento acidificante "depresso" sono stati anche quelli con i valori più bassi in assoluto (0,35-0,49).

I risultati ottenuti sono in accordo con quanto descritto da altri autori (Badis *et al.*, 2004; Herreros *et al.*, 2003; Pedonese *et al.*, 2002). Studi recenti hanno messo in evidenza come anche la specie *Lc. raffinolactis*, pur non possedendo attività caseinolitica (Holler *et al.*, 1995), possa essere utilizzata come coltura starter in virtù della sua attività acidificante, se associata ad altre specie appartenenti al genere *Lactococcus*: Kimoto *et al.* nel 2012 hanno infatti rilevato che la produzione di acido lattico da parte di *Lc. raffinolactis* può essere stimolata da alcuni metaboliti prodotti da ceppi appartenenti alla specie *Lc. lactis*. Il latte fermentato realizzato con questa particolare tipologia di starter, rispetto a quello realizzato mediante l'aggiunta dei singoli ceppi, era tuttavia più acido, amaro e astringente, ma dal sapore meno salato e "umami".

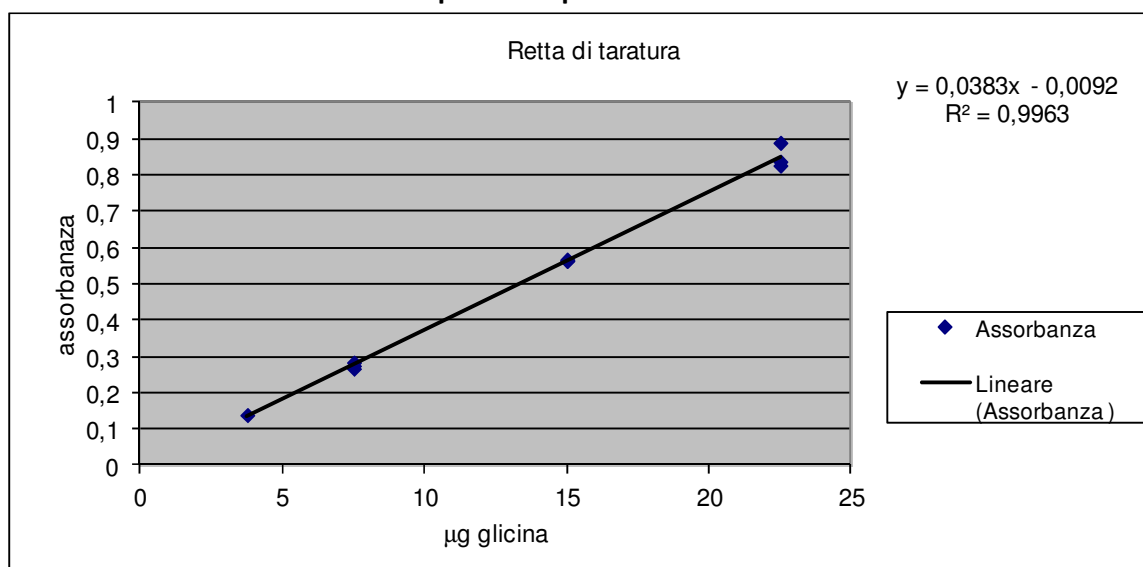
9.2.2 Valutazione dell'attività proteolitica mediante metodica spettrofotometrica

Nel Grafico 27 si può osservare la retta di taratura costruita a partire da concentrazioni scalari di glicina, necessaria per l'interpretazione dei risultati ottenuti con l'OPA test.

Nelle Tabelle 20 e 21 sono riportati i risultati relativi all'attività proteolitica rispettivamente di *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp.

I Grafici 28 e 29 mostrano l'entità dell'attività proteolitica dei ceppi esaminati, suddivisi in base ai due generi di appartenenza *Lactobacillus* e *Lactococcus*.

Graf.27: Retta di taratura costruita per l'interpretazione dei dati derivanti dall'OPA test

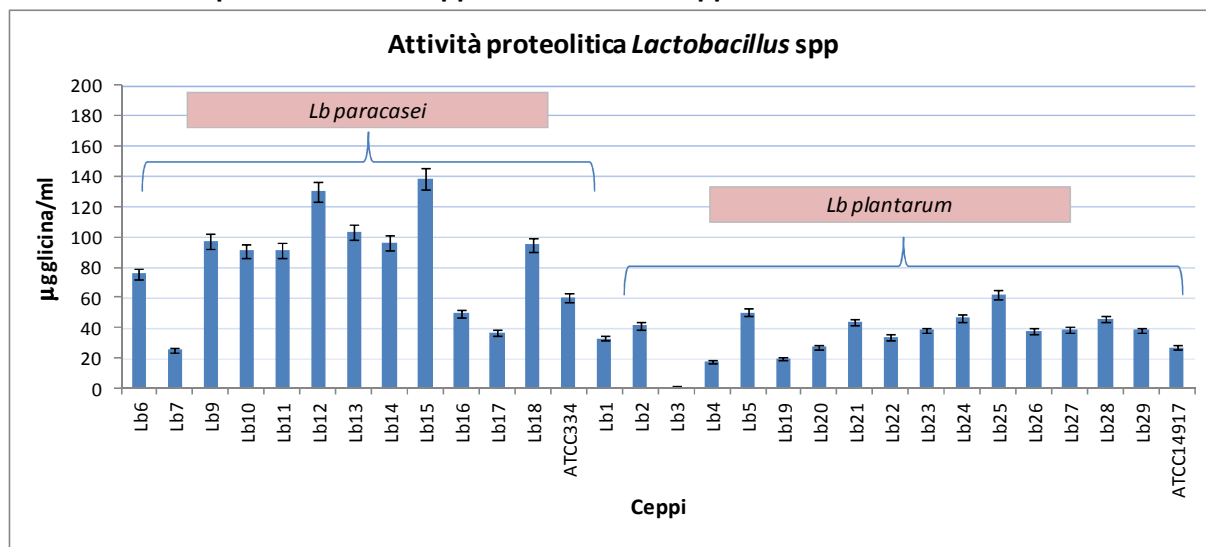


Tab.20: Attività proteolitica dei ceppi di *Lactobacillus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	µg glicina/ml
Lb1	PCS	<i>Lb plantarum</i>	33,22
Lb2	PCS	<i>Lb plantarum</i>	41,42
Lb3	PCS	<i>Lb plantarum</i>	1,23
Lb4	PCS	<i>Lb plantarum</i>	17,77
Lb5	PCS	<i>Lb plantarum</i>	50,35
Lb6	PCS	<i>Lb paracasei</i>	75,68
Lb7	PCS	<i>Lb paracasei</i>	25,40
Lb9	PMP	<i>Lb paracasei</i>	97,28
Lb10	PMP	<i>Lb paracasei</i>	90,76
Lb11	PMP	<i>Lb paracasei</i>	91,14
Lb12	PMP	<i>Lb paracasei</i>	130,24
Lb13	PMP	<i>Lb paracasei</i>	103,43
Lb14	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	96,16
Lb15	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	138,25
Lb16	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	49,61
Lb17	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	37,13
Lb18	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	94,86
Lb19	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	20,00
Lb20	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	27,64
Lb21	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	44,02
Lb22	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	33,78
Lb23	PL	<i>Lb plantarum</i>	38,44
Lb24	PL	<i>Lb plantarum</i>	46,44
Lb25	PL	<i>Lb plantarum</i>	61,71
Lb26	PL	<i>Lb plantarum</i>	38,06
Lb27	PL	<i>Lb plantarum</i>	38,81
Lb28	PL	<i>Lb plantarum</i>	46,07
Lb29	PL	<i>Lb plantarum</i>	38,44
ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>	27,33
ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>	60,02

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

Graf.28: Attività proteolitica dei ceppi di *Lactobacillus* spp



L'attività proteolitica rilevata nei ceppi è stata mediamente più elevata per la specie *Lb. paracasei*, rispetto a *Lb. plantarum*. Il valore medio di attività proteolitica per *Lb. paracasei* è stato infatti di 78,77 µg di glicina/ml liberati, con un valore minimo di 25,40 µg di glicina/ml (Lb7) e massimo di 138,25 µg di glicina/ml (Lb15). Lb7 aveva anche la minore attività acidificante registrata. Il valore medio di attività proteolitica relativo a *Lb. plantarum* è stato di 35,57 µg di glicina/ml, ben più basso rispetto a quello rilevato per *Lb. paracasei*. In questo caso, il valore minimo è stato pari a 1,23 µg di glicina/ml (Lb3), mentre quello massimo è stato di 61,71 µg di glicina/ml (Lb25).

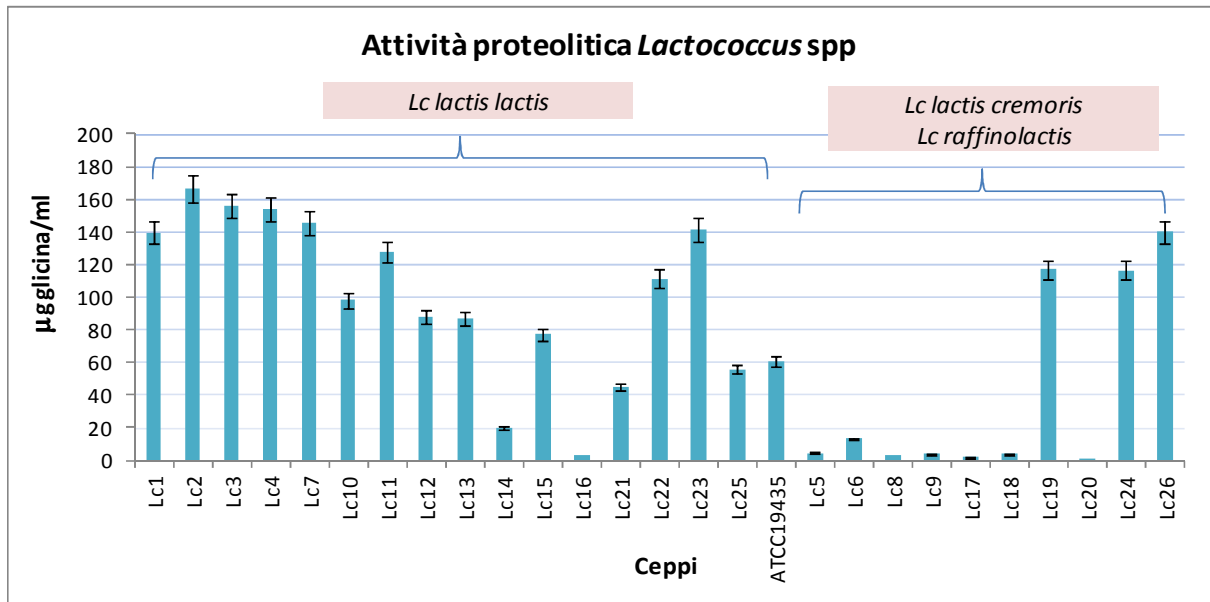
Già nel 1987, Hegazi e Abo-Elnaga mettevano in rilievo la maggiore attività proteolitica di *Lb. paracasei*, rispetto a *Lb. plantarum*, correlandola anche con l'origine strettamente casearia della prima specie, rispetto alla seconda. Secondo gli Autori infatti una maggiore esposizione nei confronti di substrati proteici avrebbe favorito un migliore adattamento dei sistemi proteolitici. In merito a *Lb. plantarum* anche Xanthopoulos *et al.* (2000) e Ztaliou *et al.* (1996) hanno osservato un'attività proteolitica generalmente contenuta. Khalid e Marth (1990) osservavano inoltre che *Lb. plantarum* degrada preferibilmente la β -caseina, mentre la α_{s1} -caseina è idrolizzata occasionalmente solo da alcuni ceppi. In più sembra che l'attività proteolitica di *Lb. plantarum* sia maggiore a 15°C e 45°C ed in un mezzo colturale con un range di pH da 5,6 a 6,2 (de Giori *et al.*, 1985).

Tab.21: Attività proteolitica dei ceppi di *Lactococcus* spp

Sigla	Provenienza	Specie	µg glicina/ml
Lc1	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	139,55
Lc2	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	166,00
Lc3	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	155,94
Lc4	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	153,89
Lc5	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	4,58
Lc6	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	13,30
Lc7	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	145,70
Lc8	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	3,28
Lc9	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	3,84
Lc10	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	98,21
Lc11	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	127,82
Lc12	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	87,97
Lc13	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	86,67
Lc14	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	20,19
Lc15	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	77,17
Lc16	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	3,28
Lc17	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	1,69
Lc18	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	3,80
Lc19	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	116,83
Lc20	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	0,86
Lc21	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	45,14
Lc22	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	111,25
Lc23	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	141,42
Lc24	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	116,46
Lc25	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	55,94
Lc26	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	139,93
ATCC 19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>	60,45

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli

Graf.29: Attività proteolitica dei ceppi di *Lactococcus* spp



Come risulta evidente dal Grafico 29, l'attività proteolitica rilevata nei ceppi appartenenti al genere *Lactococcus* è risultata essere molto eterogenea, con ceppi aventi attività pressoché nulla e ceppi, al contrario, spiccatamente proteolitici. I due ceppi appartenenti alla specie *Lc. raffinolactis* (Lc5, Lc6) hanno mostrato un'attività irrilevante, con valori pari a 4,58 μg di glicina/ml e 13,30 μg di glicina/ml, rispettivamente. L'attività proteolitica media registrata per la subspecie *lactis* è stata pari a 98,62 μg di glicina/ml, con un valore massimo di 166 μg di glicina/ml (Lc2) e minimo di 3,28 μg di glicina/ml (Lc16). L'attività media della subspecie *cremoris* è stata invece pari a 48,34 μg di glicina/ml, con un valore massimo pari a 139,93 μg di glicina/ml (Lc26) e minimo pari a 0,86 μg di glicina/ml (Lc20). I risultati ottenuti sono in accordo con Gonzalez *et al.* (2010), Herreros *et al.* (2003) e Perez *et al.* (2003), secondo i quali i lattococchi risultano più proteolitici rispetto ai lattobacilli.

In uno studio sulla caratterizzazione tecnologica di ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* isolati dal formaggio Cabrales, Mayo *et al.* (1990) hanno osservato una buona correlazione tra l'attività acidificante e quella proteolitica: i ceppi in grado di coagulare rapidamente il latte erano anche i più proteolitici. Lo stesso trend è stato osservato anche da Nieto-Arribas *et al.* (2009). Al contrario Durlu-Ozkaya *et al.* (2001) e Requena *et al.* (1991) hanno osservato che i ceppi con la maggiore attività acidificante non sempre sono i più proteolitici.

Nel presente studio è stato osservato che i ceppi più acidificanti erano allo stesso tempo anche i più proteolitici. Ciò potrebbe in via generale essere giustificato dal fatto che ceppi più acidificanti, essendo in grado di metabolizzare più velocemente il lattosio (e quindi produrre più acido lattico), riescono anche a sviluppare più velocemente e a degradare quindi in misura maggiore le proteine.

9.2.3 Resistenza a diverse temperature di sviluppo e a diverse concentrazioni di cloruro di sodio

In Tabella 22 e 23 sono riportati, per i ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Lactococcus* rispettivamente, i risultati relativi alle prove di sviluppo a temperature di 40°C, 43°C e 45°C ed a concentrazioni di cloruro di sodio pari a 4,5%, 6% e 6,5%.

Tab.22: Resistenza di *Lactobacillus* spp a temperature e concentrazioni di cloruro di sodio diverse

Sigla	Provenienza	Specie	40°C	43°C	45°C	4,5%NaCl	6% NaCl	6,5% NaCl
Lb1	PCS	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb2	PCS	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	-
Lb3	PCS	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb4	PCS	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb5	PCS	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb6	PCS	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb7	PCS	<i>Lb paracasei</i>	+	+	+	+	+	+
Lb9	PMP	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb10	PMP	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb11	PMP	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	-
Lb12	PMP	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb13	PMP	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	-
Lb14	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	-
Lb15	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	-
Lb16	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	-
Lb17	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb18	PPMSM	<i>Lb paracasei</i>	+	+	-	+	+	+
Lb19	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb20	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb21	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	-
Lb22	PPMSM	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	-
Lb23	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb24	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb25	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb26	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb27	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb28	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
Lb29	PL	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
ATCC14917	Ceppo Referenza	<i>Lb plantarum</i>	+	+	-	+	+	+
ATCC334	Ceppo Referenza	<i>Lb casei</i>	+	+	-	+	+	+

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli
 +: crescita batterica;-:assenza di crescita batterica

Tutti i ceppi erano in grado di crescere a temperature pari a 40°C e 43°C. Questo dato rispecchia la natura mesofila delle specie indagate. Incrementando comunque la temperatura di soli 2°C e sottoponendo i ceppi a 45°C per 24 ore, questi perdevano la capacità di sviluppare,

sia che essi appartenessero alla specie *Lb. plantarum*, che alla specie *Lb. paracasei*. Solo un ceppo, Lb7, appartenente alla specie *Lb. paracasei* è stato in grado di sviluppare a temperatura di 45°C. Questo ceppo inoltre era lo stesso che presentava le minori attività proteolitica ed acidificante tra tutti i ceppi di *Lb. paracasei* analizzati.

Per quanto riguarda la resistenza al cloruro di sodio, tutti i ceppi erano in grado di crescere in presenza del 4% e del 6% di sale. Una buona percentuale di ceppi (70,96%) è stata in grado di tollerare anche una concentrazione pari al 6,5% di sale. Tra questi, solo uno dei ceppi appartenenti alla specie *Lb. plantarum* (Lb2) non è riuscito a crescere in presenza del 6,5% di sale, i restanti ceppi inabili a crescere appartenevano tutti alla specie *Lb. paracasei* (Lb8, Lb11, Lb13-Lb16).

Tab.23 Resistenza di *Lactococcus* spp a temperature e concentrazioni di cloruro di sodio diverse

Sigla	Provenienza	Specie	40°C	43°C	45°C	4,5% NaCl	6% NaCl	6,5% NaCl
Lc1	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc2	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc3	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc4	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc5	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	+	+	-	-	-	-
Lc6	PCS	<i>Lc raffinolactis</i>	+	+	-	-	-	-
Lc7	PCS	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc8	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	+	+	-	-
Lc9	PMP	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	+	+	-	-
Lc10	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc11	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc12	PMP	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc13	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc14	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc15	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc16	PL	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	W	-
Lc17	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	-	-	-
Lc18	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	-	-	-
Lc19	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	+	-	-
Lc20	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	-	-	-
Lc21	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc22	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc23	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc24	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	+	-	-
Lc25	PPMSM	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	+	-	-
Lc26	PPMSM	<i>Lc lactis cremoris</i>	+	+	-	+	-	-
ATCC 19435	Ceppo Referenza	<i>Lc lactis lactis</i>	+	+	-	W	-	-

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli
 +: crescita batterica; -: assenza di crescita batterica; w: crescita batterica debole

Tutti i ceppi appartenenti al genere *Lactococcus* erano in grado di crescere a temperature pari a 40°C e 43°C. Solamente 2 ceppi appartenenti alla subspecie *cremoris* erano invece in grado di crescere a 45°C, benché questa subspecie sia da sempre considerata meno resistente al calore della subsp. *lactis*. Cinque ceppi non erano in grado di crescere in presenza del 4,5% di sale: due appartenevano alla specie *Lc. raffinolactis* (Lc5 e Lc6) e tre alla specie *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Lc17-18 e Lc20). Questi ultimi tre ceppi erano gli stessi che presentavano il gene di resistenza verso la tetraciclina. Nessuno dei ceppi è stato pienamente in grado di sviluppare in presenza del 6% e del 6,5% di sale, benché alcuni ceppi appartenenti alla subspecie *lactis* presentassero un lieve sviluppo in presenza del 6% di sale (Lc1, Lc3, Lc4, Lc7, Lc13-Lc16). Si evidenzia comunque la capacità di alcuni ceppi (5 su 8 testati) appartenenti alla specie *Lc. lactis* subsp. *cremoris* di crescere a concentrazioni di cloruro di sodio superiori al 2%, parametro utilizzato per la distinzione tassonomica tra la subsp. *lactis* e *cremoris*. Questo dato conferma quanto

osservato in uno studio di Nomura *et al.* (2006) nel quale si evidenzia la capacità di 6 ceppi di *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, su un totale di 41 *Lc. lactis* testati, di crescere in presenza del 4% di NaCl. In questo stesso studio viene osservata inoltre la capacità di ceppi di *Lc. lactis* di origine non casearia di crescere in presenza anche del 6,5% di NaCl.

9.2.4 Caratterizzazione delle attività enzimatiche/fermentative mediante API system

9.2.4.1 Caratterizzazione del profilo metabolico di *Lactobacillus* spp mediante API50 CH

All'interno dei ceppi appartenenti alla specie *Lb. plantarum* (n=16) è stato possibile evidenziare 5 diversi profili metabolici, mentre i ceppi appartenenti alla specie *Lb. paracasei* (n=12) si sono suddivisi in ben 7 distinti profili.

Nessuno dei ceppi testati era in grado di fermentare: glicerolo (gly), eritrolo (ery), D-arabinosio (dara), L-xilosio (lxy), adonitolo (ado), β -metil-xiloside (mdx), dulcitolo (dul), inositolo (ino), α metil-d-mannopiranoside (amd), glicogeno (glyg), xilitolo (xlt), d-fucosio (d-fuc), l-fucosio (l-fuc), 2 cheto-gluconato (2kg), 5 chetogluconato (5kg).

Tutti i ceppi erano in grado di fermentare: ribosio (rib), galattosio (gal), D-glucosio (glu), D-fruttosio (fru), D-mannosio (mne), mannitolo (man), N-acetil-glucosammina (nag), lattosio (lac), trealosio (tre).

Tutti i ceppi erano in grado di idrolizzare l'esculina (esc).

Nella Tabella 24 sono riportati solo gli zuccheri per i quali sono state osservate attività metaboliche variabili da ceppo a ceppo; nello specifico L-arabinosio (lara), D-xilosio (dxy), L-sorbosio (sbe), ramnosio (rha), sorbitolo (sor), α -metil-D-mannoside (mdm), α -metil-D-glucoside (mdg), amigdalina (amy), arbutina (arb), salicina (sal), cellobiosio (cel), maltosio (mal), melibiosio (mel), saccarosio (sac), inulina (inu), melezitiosio (mlz), D-raffinosio (raf), b-gentibiosio (gen), D-turanosio (tur), D-lixosio (lyx), D-tagatosio (tag), D-arabitololo (darl), L-arabitololo (larl), gluconato (gnt).

In alcuni casi è stato possibile osservare delle reazioni deboli (indicate nella tabella con la lettera "W"), che sono state comunque associate alle reazioni negative (-) al fine del raggruppamento dei diversi profili. Tali profili sono evidenziati nella Tabella 24 dai diversi colori. La capacità di alcuni ceppi di fermentare alcuni zuccheri, quali oligosaccaridi (raffinosio, melizitosio) e frutto-oligosaccaridi (inulina), considerati prebiotici, potrebbe essere interessante per la selezione degli stessi come colture probiotiche.

Tab.24: Profilo fermentativo di *Lactobacillus* spp

SIGLA	PROVENIENZA	l ara	dxyl	sbe	rha	sor	mdm	mdg	amy	arb	sal	cel	mal	mel	sac	inu	mlz	raf	gen	tur	lyx	tag	darl	larl	gnt
Lb1	PCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lb2	PCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Lb3	PCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lb4	PCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lb5	PCS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Lb19	PPMSM	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lb20	PPMSM	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
Lb21	PPMSM	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
Lb22	PPMSM	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
Lb23	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Lb24	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb25	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb26	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb27	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb28	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb29	PL	+	-	-	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	w	-	
Lb6	PCS	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
Lb7	PCS	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
Lb9	PMP	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	w	w	-	+	-	+	+	-	+	-	+	
Lb10	PMP	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	w	w	-	+	-	+	+	-	+	-	+	
Lb11	PMP	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	
Lb12	PMP	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	w	w	-	+	-	+	+	-	+	-	+	
Lb13	PMP	-	-	-	+	+	-	-	w	+	+	+	w	w	+	+	+	-	w	+	w	+	-	w	
Lb14	PPMSM	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
Lb15	PPMSM	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
Lb16	PPMSM	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	w	
Lb17	PPMSM	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
Lb18	PPMSM	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	w	

Lb plantarum

Lb paracasei

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli; test positivo: +; test negativo: -; reazione debole: W

9.2.4.2 Caratterizzazione del profilo metabolico di *Lactococcus* spp mediante API20 Strep

E' stato possibile osservare una notevole biodiversità fenotipica con la presenza di ben 16 profili diversi tra i 26 ceppi analizzati. Tra i ceppi appartenenti alla specie *Lc. lactis* subsp. *lactis* (n=16) sono stati osservati 7 diversi profili, mentre tra i ceppi appartenenti alla specie *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (n=8), sono stati osservati 5 profili. Gli unici 2 *Lc. raffinolactis* testati hanno presentato ciascuno un profilo unico.

Tutti i ceppi testati sono risultati essere positivi al test di Voges-Proskauer per la produzione di acetoino (vp) ed in grado di fermentare il lattosio (lac).

Nessuno dei ceppi possedeva l'enzima β -glucuronidasi (β gur), né era in grado di fermentare l'arabinosio (ara), il sorbitolo (sor) ed il glicogeno (glyg).

Inoltre, tutti i ceppi testati sono risultati essere negativi per il test della β -emolisi.

Sono state osservate diverse attività metaboliche per quanto riguarda idrolisi dell'acido ippurico (hip), idrolisi dell'esculina (esc), pirrolidonil arilamidasi (pyr), α -galattosidasi (α gal), β -galattosidasi (β gal), fosfatasi alcalina (pal), leucina aminopeptidasi (lap), arginina diidrolasi (adh), fermentazione del D-ribosio (rib), D-mannitolo (man), trealosio (tre), inulina (inu), D-raffinosio (raf), amido (amido).

In alcuni casi è stato possibile osservare delle reazioni deboli (indicate nella tabella con la lettera "W"), che sono state poi associate con le reazioni negative (-) al fine del raggruppamento dei profili. I diversi profili sono evidenziati nella Tabella 25 con diversi colori.

Anche in questo caso i ceppi in grado di fermentare zuccheri particolari, quali il raffinosio e l'inulina, potrebbero trovare applicazione come colture probiotiche. Tuttavia solamente i ceppi appartenenti alla specie *Lc. raffinolactis* possedevano questa caratteristica. Inoltre i ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* in grado di produrre β -galattosidasi potrebbero rappresentare un valido aiuto per la digestione del lattosio.

La capacità dei ceppi di fermentare zuccheri diversi dal lattosio e sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli risulterebbe inutile in un substrato di crescita ricco come il latte. D'altra parte, ceppi di *Lc. lactis* sono spesso isolati da matrici vegetali, molto meno meno ricche di nutrienti, umidità e capacità tampone, rispetto al latte. In uno studio di Nomura *et al.* (2006), si mette in evidenza proprio l'abilità di ceppi di origine vegetale di fermentare molti più zuccheri (saccarosio e arabinosio), rispetto a quelli di origine casearia. In questo stesso studio si evidenzia anche la singolare inabilità di alcuni ceppi di origine casearia a fermentare il lattosio.

In via generale, comunque, gli zuccheri non fermentabili dai microrganismi vanno ad indurre uno stress iperosmotico della cellula ed il conseguente accumulo di soluti compatibili (rappresentati dagli stessi zuccheri non fermentabili oppure da altre molecole). Questo fatto sembrerebbe aumentare la successiva resistenza dei ceppi al processo di essiccamento cui vanno incontro durante, ad esempio, il processo di liofilizzazione, per la realizzazione di colture prontamente utilizzabili in caseificio. Quando infatti l'umidità viene a diminuire, questi zuccheri non fermentati sono preferenzialmente esclusi dalla membrana cellulare, permettendole di rimanere idratata (Santivarangkna *et al.*, 2008).

Tab.25: Profilo API20 STREP di *Lactococcus* spp

SIGLA	PROVENIENZA	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	β HEM
Lc1	PCS	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc2	PCS	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc3	PCS	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	W	-	-
Lc4	PCS	+	-	+	+	W	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc7	PCS	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	W	-	-
Lc10	PMP	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc11	PMP	+	W	+	+	-	-	+	W	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc12	PMP	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Lc13	PL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	W	-	-
Lc14	PL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc15	PL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	W	-	-
Lc16	PL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	W	-	-
Lc21	PPMSM	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc22	PPMSM	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc23	PPMSM	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc25	PPMSM	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc8	PMP	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc9	PMP	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc17	PPMSM	+	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc18	PPMSM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc19	PPMSM	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	W	-	-
Lc20	PPMSM	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Lc24	PPMSM	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Lc26	PPMSM	+	-	+	-	-	-	-	-	W	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Lc5	PCS	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Lc6	PCS	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli; test positivo: +; test negativo: -; reazione debole: W

9.3 Selezione dei ceppi e studio della loro biodiversità mediante metodo genotipico

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Al fine di utilizzare i ceppi selezionati quali colture starter o colture aggiuntive secondarie, alcuni ceppi appartenenti alle specie di maggiore interesse in ambito lattiero-caseario, *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*) e *Lactobacillus paracasei*, sono stati sottoposti ad indagine genotipica tramite la tecnica *Multilocus Sequence Typing (MLST)*.

I ceppi da sottoporre a tale metodica sono stati selezionati in base alla massima eterogeneità di isolamento e di profilo fenotipico osservato. Il *typing* tramite MLST ha permesso di mettere in evidenza diversi *cluster* sulla base della provenienza geografica dei ceppi e delle attitudini tecnologiche.

In questo modo sarà quindi possibile selezionare ceppi con caratteristiche tecnologiche sovrapponibili, ma comunque diversi, da impiegare alternativamente come colture starter o aggiuntive in uno stesso prodotto, in previsione di schemi di rotazione a scopo di profilassi nei confronti di possibili infezioni fagiche.

9.3.1 *Multilocus Sequence Typing (MLST): Lactobacillus paracasei*

Solamente i ceppi appartenenti alla specie *Lb. paracasei* sono stati considerati per l'analisi tramite *Multilocus Sequence Typing*, questo in virtù della loro maggiore variabilità fenotipica e del loro più frequente impiego nelle produzioni casearie, quali colture secondarie. In particolar modo sono stati scelti i ceppi Lb6, Lb7, Lb9, Lb10, Lb11, Lb14, Lb15, Lb17 e Lb18. È stato considerato inoltre il ceppo di riferimento ATCC334. L'analisi ha quindi riguardato 10 sequenze nucleotidiche. Tutte le posizioni contenenti *gap* e dati mancanti sono state eliminate. Nel *dataset* finale era presente un totale di 3176 posizioni.

Ad ogni ceppo è stata assegnata una diversa *sequence type (ST)*, derivante dalla combinazione dei differenti alleli agli 8 geni studiati. Il numero di siti polimorfici riscontrati è stato variabile (Tabella 26). In particolar modo i geni *ileS*, *lepA*, *leuS* e *recG* sono risultati essere quelli con il maggior numero di siti polimorfici (18, 16, 11 e 11, rispettivamente). I geni che hanno mostrato il minor tasso di mutazione sono stati il *16s rRNA* e il *pyrG*, con nessun sito polimorfico ed un solo allele. L'attribuzione di specie mediante 16s e MLST ha fornito risultati congruenti per tutti i ceppi testati. Tra i 9 ceppi autoctoni studiati, sono stati attribuiti 7 differenti profili ST, di cui 5 caratteristici di 1 solo ceppo (Tabella 27). La Figura 20 riporta la topologia dell'albero di *Neighbour-Joining* costruito analizzando le sequenze degli 8 geni.

Tab.26: Percentuale G+C, siti polimorfici e numero alleli di ciascun gene per *Lb. paracasei*

Locus	G+C (%) media	n. siti polimorfici	n. alleli
<i>fusA</i>	49,3	5	4
<i>ileS</i>	46,6	18	5
<i>lepA</i>	48,9	16	6
<i>leuS</i>	48,3	11	5
<i>pyrG</i>	48,1	0	1
<i>recA</i>	48,3	2	3
<i>recG</i>	48,7	11	6
<i>16s rRNA</i>	52,4	0	1

Tab.27: Profili ST dei ceppi di *Lactobacillus paracasei* analizzati

Ceppo	<i>fusA</i>	<i>ileS</i>	<i>lepA</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>recA</i>	<i>recG</i>	<i>16s</i>
Lb6	2	2	2	2	1	3	2	1
Lb7	2	4	5	1	1	1	3	1
Lb9	2	2	2	2	1	1	2	1
Lb10	2	2	2	2	1	1	2	1
Lb11	4	3	6	4	1	1	6	1
Lb14	4	3	6	4	1	1	6	1
Lb15	2	5	5	3	1	2	4	1
Lb17	1	1	1	1	1	1	1	1
Lb18	3	3	3	4	1	1	1	1
ATCC334	2	2	4	5	1	1	5	1

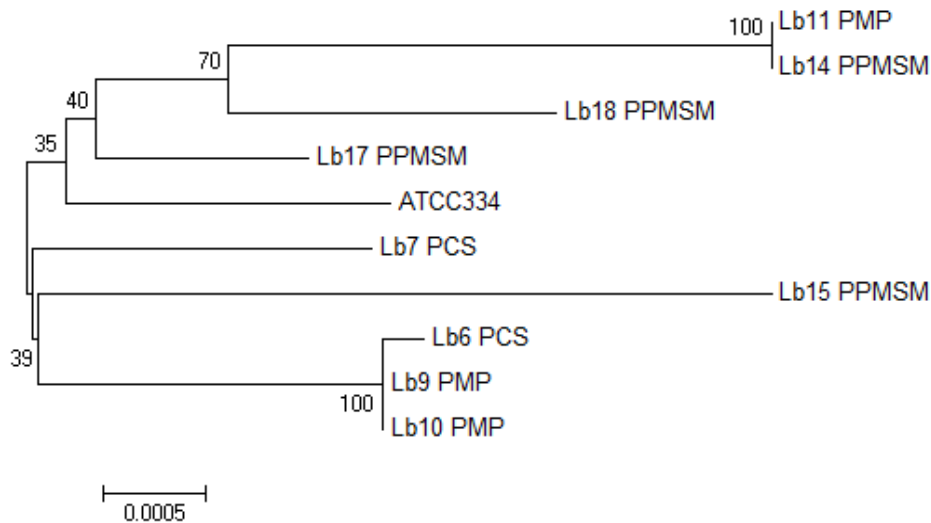


Fig.20: *Neighbor-Joining tree* dei ceppi selezionati di *Lb. paracasei*; PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli. La percentuale di alberi replicati nel *bootstrap* test (500 repliche) per i quali i *taxa* associati si raggruppavano insieme è mostrata accanto a ciascun ramo. L'albero è disegnato in scala, la lunghezza dei rami è proporzionale alla distanza evolutiva, calcolata usando il metodo di Tamura-Nei. L'unità di misura usata corrisponde al numero di sostituzioni di basi per sito.

L'albero di *Neighbour Joining* costruito per la specie *Lb. paracasei* mette in evidenza l'estrema biodiversità dei ceppi considerati. Questi tendono infatti nella maggior parte dei casi a disporsi su un singolo ramo dell'albero filogenetico e a non formare *cluster* specifici a seconda della zona di provenienza. Due ceppi provenienti dal Pecorino della Montagna Pistoiese, Lb9 e Lb10, sono risultati essere identici, così come due ceppi, Lb11 e Lb14, provenienti rispettivamente dal Pecorino della Montagna Pistoiese e Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli. In Figura 21 sono state messe a confronto le caratteristiche tecnologiche/metaboliche con l'albero di *neighbour joining* derivante dal *typing* mediante metodica MLST. Come si può osservare non sempre a profili metabolici diversi è stato associato un diverso profilo ST, allo stesso modo diversi ST hanno talvolta presentato il medesimo profilo metabolico/tecnologico.



Fig.21: *Lactobacillus paracasei*: confronto tra Neighbour Joining tree e profilo tecnologico/metabolico

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli; test positivo: +; test negativo: -

9.3.2 Multilocus Sequence Typing (MLST): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Per quanto riguarda la subsp. *lactis* sono stati selezionati 10 ceppi: Lc1, Lc2, Lc3, Lc7, Lc10, Lc11, Lc12, Lc13, Lc15 e Lc21; mentre per la subspecie *cremoris* 8 ceppi: Lc8, Lc9, Lc17, Lc18, Lc19, Lc20, Lc24 e Lc26. Sono stati inoltre considerati i due ceppi di riferimento (ATCC19435 e ATCC19257). L'analisi ha quindi riguardato 19 sequenze nucleotidiche e nel *dataset* finale era presente un totale di 4269 posizioni.

I risultati relativi al sequenziamento delle regioni parziali dei geni *pepN*, *bcaT* e *pepX* hanno fornito alcune posizioni ambigue, per le quali non è stato possibile avere un'attribuzione certa. Tali posizioni sono state quindi escluse dall'analisi. Ad ogni ceppo è stata assegnata una diversa *sequence type* (ST), derivante dalla combinazione dei differenti alleli ai 7 geni studiati. Il numero di siti polimorfici riscontrati è stato variabile (Tabella 28). A differenza di quanto riscontrato da Rademaker *et al.* (2007), i geni *pepX* e *pepN*, implicati nella degradazione delle proteine (produzione di aromi), hanno mostrato la più ampia variabilità, seguiti dai geni *atpA* e *bcaT* (105, 60, 51 e 50 siti polimorfici, rispettivamente). Nella regione V2 del gene 16S rDNA sono stati osservati solo due siti polimorfici, quelli che differenziano le due subspecie indagate. Cinque dei sette geni analizzati hanno mostrato un numero più elevato di alleli per il genotipo *cremoris* rispetto al genotipo *lactis*. Tra i 18 ceppi studiati, sono stati attribuiti 10 profili ST differenti (Tabella 29).

L'attribuzione di specie mediante 16S e MLST ha fornito un risultato congruente, eccetto che per il ceppo Lc20. Tale ceppo è stato attribuito tramite analisi della regione 16S alla subspecie *lactis*, mentre le sequenze dei singoli geni considerati per l'MLST erano più simili a ceppi appartenenti alla subspecie *cremoris*. Questo fatto potrebbe essere dovuto, come evidenziato da Pillidge *et al.* (2009), all'occorrenza nel genoma di *Lc. lactis* subsp. *cremoris* di geni 16S rRNA con sequenze tipiche di *Lc. lactis* subsp. *lactis*. La Figura 22 riporta la topologia dell'albero di *Neighbour Joining* costruito analizzando le sequenze dei 7 geni.

Tab.28: Percentuale G+C, siti polimorfici e numero alleli di ciascun gene per le subsp. *lactis* e *cremoris*

Locus	G+C (%) media	n. siti polimorfici	n. alleli <i>lactis</i>	n. alleli <i>cremoris</i>
<i>atpA</i>	43,4	51	3	4
<i>rpoA</i>	40,75	13	2	4
<i>pheS</i>	40,5	28	3	4
<i>bcaT</i>	38,5	50	3	2
<i>pepN</i>	37,1	60	2	5
<i>pepX</i>	40,5	105	4	4
16S rRNA	50,8	2	1	2

Tab.29: Profili ST dei ceppi di *Lactococcus* spp analizzati

Ceppo	atpA	bcaT	pepN	pepX	pheS	rpoA	16s
Lc1	1	1	1	1	1	1	1
Lc2	1	1	1	1	1	1	1
Lc3	1	1	1	1	1	1	1
Lc7	1	1	1	1	1	1	1
Lc8	4	4	3	5	4	3	2
Lc9	4	4	3	5	4	3	2
Lc10	3	2	2	2	2	1	1
Lc11	3	2	2	2	2	1	1
Lc12	3	3	2	3	1	1	1
Lc13	2	3	1	3	1	1	1
Lc15	2	3	1	3	1	1	1
Lc17	5	4	4	6	5	4	2
Lc18	5	4	4	6	5	4	2
Lc19	6	5	5	7	6	5	3
Lc20	5	4	4	6	5	4	1
Lc21	5	4	4	6	5	4	1
Lc24	6	5	6	8	6	5	3
Lc26	6	5	6	8	6	6	3
ATCC19435	1	3	1	4	3	2	1
ATCC19257	7	4	7	6	7	4	2

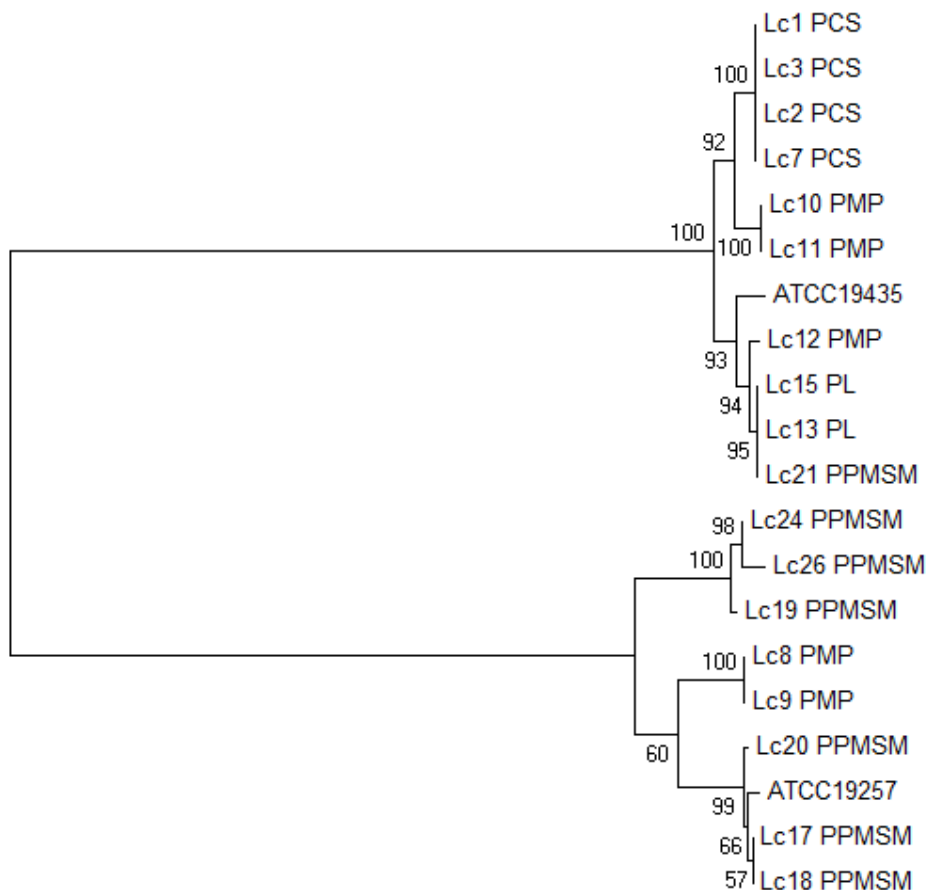


Fig.22: *Neighbor-Joining tree* dei ceppi selezionati di *Lactococcus* spp; PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli. La percentuale di alberi replicati nel *bootstrap test* (500 repliche) per i quali i *taxa* associati si raggruppavano insieme è mostrata accanto a ciascun ramo. L'albero è disegnato in scala, la lunghezza dei rami è proporzionale alla distanza evolutiva, calcolata usando il metodo di Tamura-Nei. L'unità di misura usata corrisponde al numero di sostituzioni di basi per sito.

Come si può osservare nella Figura 22 i ceppi appartenenti alla specie *Lc. lactis* subsp. *lactis* e quelli appartenenti alla specie *Lc. lactis* subsp. *cremoris* si suddividono in due distinti *cluster*. Inoltre, all'interno degli stessi *cluster* i ceppi tendevano generalmente a raggrupparsi a seconda della provenienza. Molti dei *lactis* pur presentando diversi profili fenotipici hanno rivelato poi un identico profilo ST. E' stata osservata una maggiore variabilità per i ceppi appartenenti alla subsp. *cremoris*. Come è noto vi sono infatti dei ceppi appartenenti a questa subspecie che possono mostrare un fenotipo tipico della subsp. *lactis* ed un genotipo *cremoris*. E' questo il caso dei ceppi Lc8 ed Lc9, isolati dal Pecorino della Montagna Pistoiese, e Lc19, Lc24 ed Lc26, isolati dal Pecorino del Parco di Migliarino-S.Rossore-Massaciuccoli, tra l'altro con diversi profili MLST. A differenza di questi, i ceppi Lc17 e Lc18 hanno presentato sia un fenotipo che un

genotipo caratteristici della subsp. *cremoris*. Il ceppo Lc20, che era invece caratterizzato da un fenotipo e un profilo MLST tipico della subsp. *cremoris*, si è collocato nel *cluster* dei ceppi Lc17 e Lc18, pur discostandosi da questi a causa della sequenza 16S tipica della subsp. *lactis*.

Come evidenziato da altri Autori, la specie *Lc. lactis* è caratterizzata quindi da una complessa struttura tassonomica, resa evidente anche dai genomi completi ad oggi pubblicati di alcuni ceppi (Wegmann *et al.*, 2007; Bolotin *et al.*, 2004). Tra questi vi sono i ben noti IL-1403, MG363 e SK11, tutti di origine casearia. Il primo, contraddistinto da un fenotipo e genotipo *lactis*; il secondo da fenotipo *lactis* e genotipo *cremoris*; infine il terzo tipicamente *cremoris*. La presente tesi di dottorato, insieme ad altri studi (Nomura *et al.*, 2006; van Hylckama *et al.*, 2006), dimostra tuttavia che questi tre modelli non rappresentano altro che una piccola parte della biodiversità racchiusa all'interno di questa specie. Può essere verosimile infatti che i ceppi autoctoni isolati dal latte abbiano un'origine ambientale. L'adattamento a diverse matrici, quali substrati vegetali, sembrerebbe dare vita a fenotipi con caratteristiche particolari, utilizzabili poi sia in processi di fermentazione caseari, che di altra natura (van Hylckama *et al.*, 2006).

In Figura 23 sono state messe a confronto le caratteristiche tecnologiche/metaboliche con l'albero di *Neighbour-Joining* derivante dal *typing* mediante metodica MLST. Come si può osservare, non sempre a profili metabolici diversi è stato associato un diverso profilo ST; allo stesso modo diversi ST hanno talvolta presentato il medesimo profilo metabolico/tecnologico.

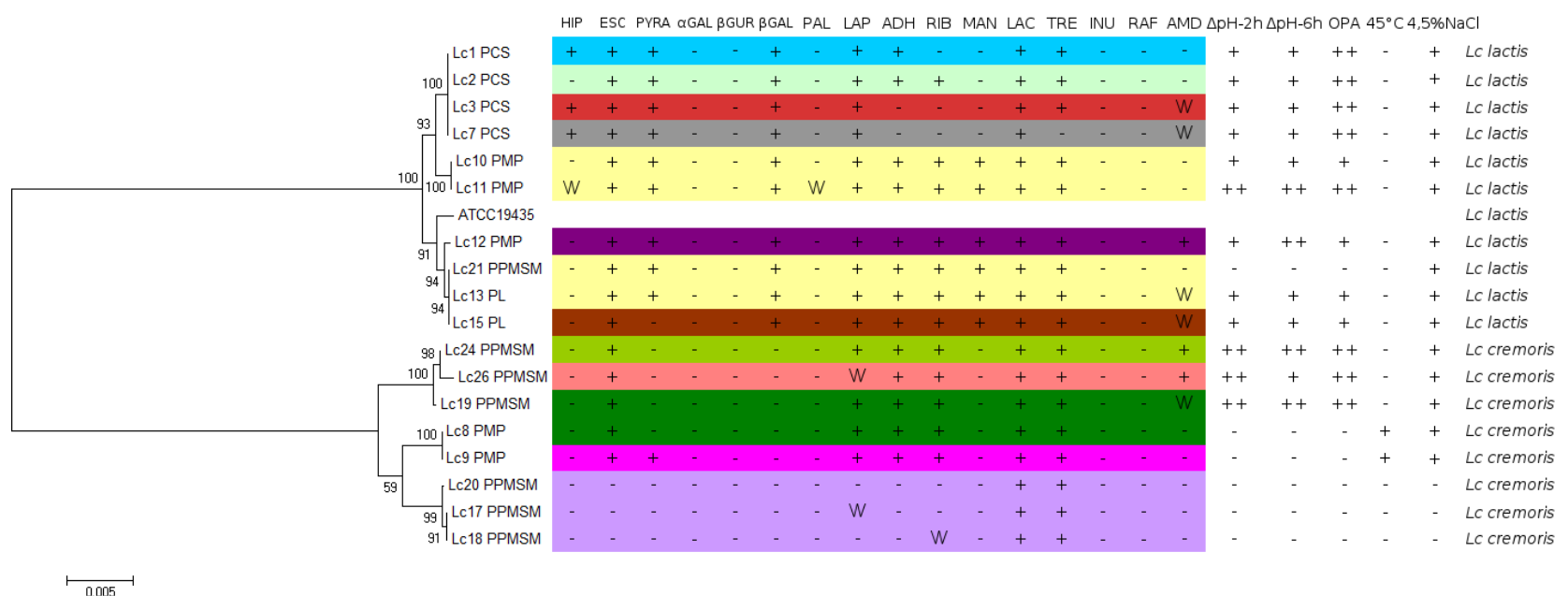


Fig.23: *Lactococcus lactis*: confronto tra Neighbour Joining tree e profilo tecnologico/metabolico

PCS: Pecorino Crete Senesi; PMP: Pecorino Montagna Pistoiese; PL: Pecorino della Lunigiana; PPMSM: Pecorino del Parco di Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli; test positivo: +; test negativo: -

10. Conclusioni

L'obiettivo primario della presente tesi di dottorato è stato quello di caratterizzare ceppi autoctoni di batteri lattici per un loro potenziale utilizzo, come colture starter o secondarie, in prodotti lattiero-caseari caratteristici di una particolare zona di produzione.

Il vantaggio dell'impiego di microrganismi autoctoni selezionati è duplice: da una parte, è garantita la standardizzazione delle produzioni, difficilmente gestibile mediante l'impiego di starter naturali (siero-innesti o latte-innesti); dall'altra sono salvaguardate le peculiarità organolettiche dei prodotti tradizionali che, con l'utilizzo di starter commerciali, rischierebbero altrimenti di andare perdute.

L'impiego di starter industriali ha ridotto la diversità dei prodotti fermentati. La ricerca di ceppi "wild" da ambienti non ancora "contaminati" potrebbe tuttavia invertire questa tendenza e garantire una maggiore biodiversità microbiologica all'interno dei prodotti stessi.

E' noto che l'impiego dei batteri lattici in ambito alimentare ha avuto inizio, in maniera inconsapevole, migliaia di anni fa. In virtù di questo tali microrganismi sono considerati assolutamente sicuri nei confronti della salute umana. La sicurezza, tuttavia, rimane il prerequisito fondamentale al fine di poter utilizzare nuovi ceppi nell'ambito dell'industria alimentare. Nel processo di selezione è quindi doveroso valutare la presenza di geni codificanti resistenze nei confronti di antibiotici comunemente utilizzati in medicina umana e veterinaria. Questo problema è stato tuttavia sottovalutato per molto tempo e solo a partire dalla fine degli anni Novanta sono comparsi in bibliografia i primi articoli in merito. Recentemente inoltre sono stati pubblicati studi in merito ad alcuni, per fortuna rari, casi di infezioni correlate con la presenza di batteri lattici, soprattutto appartenenti al genere *Lactococcus* e quindi diversi dagli enterococchi, già noti come patogeni opportunisti. Il presente studio, in accordo con quello di altri Autori, ha messo in evidenza come il fenomeno dell'antibiotico-resistenza sia limitato nell'ambito delle flore lattiche indagate. In ogni caso, i pochi ceppi (n=3) risultati essere resistenti alla tetraciclina e che allo stesso tempo albergavano il gene *tet(M)*, potrebbero essere sottoposti ad ulteriori indagini, quali il sequenziamento del gene *tet(M)* stesso, per studiare l'omologia della sequenza con quella riscontrata in germi patogeni, e la valutazione della presenza di ulteriori fattori di "virulenza".

Questo studio ha inoltre messo in evidenza un problema di primaria importanza, quale la necessità di standardizzare le metodiche legate alla valutazione dell'antibiotico-resistenza.

Oltre all'aspetto della sicurezza questo studio ha preso in considerazione la biodiversità dei microrganismi indagati, confrontando diversi tipi di approccio, basati sia su metodiche fenotipiche, che genotipiche. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una notevole biodiversità per quanto concerne il profilo metabolico e tecnologico dei ceppi. Questa biodiversità è andata ben oltre quella rilevata tramite l'approccio puramente genetico della metodica MLST. Tuttavia, lo studio del genoma dei microrganismi è risultato essere di primaria importanza, non solo per una sicura attribuzione tassonomica dei microrganismi, ma anche perché solo attraverso l'indagine genotipica è stato possibile ottenere una soddisfacente identificazione a livello di ceppo. Grazie alla presente ricerca sarà quindi possibile eliminare le

ridondanze presenti a livello di ceppoteca ed offrire a produttori locali ceppi microbici da impiegare in caseificazioni come colture starter o colture secondarie. Questi ceppi, non solo soddisfano i criteri di sicurezza per quanto concerne il profilo di antibiotico-resistenza, ma risultano essere caratterizzati da particolari profili metabolico/tecnologici. Questa diversità si traduce in termini applicativi, nella possibilità di scegliere i ceppi dai tratti fenotipici più consoni, in base al processo produttivo nei quali dovranno essere impiegati ed alle qualità organolettiche che si intende ottenere nel prodotto finito.

Bibliografia

- Aarestrup F.M., Agerso Y., Gerner–Smidt P., Madsen M., Jensen L.B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Micr. Infec. Dis.* 37:127-137.
- Amabile-Cuevas C. (2003). New antibiotics and new resistance. *American Scientist* 91 (2):138.
- Amàrita F., Fernàndez-Espla D., Requena T., Pelaez C. (2001). Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:189-195.
- Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N. and Mackie R.I. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1):22.
- Ammor M.S., Florez A.B., Mayo B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24:559–570.
- Antolín J., Cigüenza R., Salueña I., Vázquez E., Hernández J., Espinós D. (2004). Liver abscess caused by *Lactococcus lactis cremoris*: a new pathogen. *Scand. J. Infect. Dis.* 36(6-7):490-491.
- Antonsson M., Molin G., Ardö Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int. J. Food. Microbiol.* 85:159-169.
- Axelsson L.T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S., von Wrigth A. (eds), *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, New York, NY, 1-64.
- Aureli P., Capurso L., Castellazzi A. M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F. e Zuccotti G. V. (2010). Probiotici e salute, stato dell'arte basato sulle evidenze. Pacini Editore S.p.A., Pisa.
- Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E., Kihal M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21:579-588.

- Bartocci E., Ortenzi R., Codega de Oliveira Vizzani A., Cenci Goga B. (2004). Caratterizzazione fenotipica e genotipica di *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. resistenti ad alcuni antimicrobici isolati da prodotti lattiero-caseari. Atti del XIV Convegno nazionale A.I.V.I., Santuario di Vicoforte (CN), 4-6 Giugno 2004, pp 181-188.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. and Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
- Bautista-Garfias C.R., Ixta-Rodriguez O., Martinez-Gomez F. (2001). Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* 8(2):S226-S228.
- Belletti N., Gatti M., Bottari B., Neviani E., Tabanelli G. e Gardini F. (2009). Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *J. of Food Protection.* 72 (10): 2162–2169.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1991). Ed. William and Wilkins, Baltimore.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994). Ed. William and Wilkins, Baltimore.
- Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E.D., Johnston M.D., Barton H.A., Wright G.D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE* 7(4): e34953. doi:10.1371/journal.pone.0034953.
- Bilhere E., Lucas P. M., Claisse O., Lonvaud-Funel A. (2009). Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1291–1300.
- Billot-Klein D., Gutmann L., Sable S., Guittet E. and Van Heijenoort J. (1994). Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* 176(8):2398-2405.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S., Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11:731-753.

- Bottazzi V. (1993). *Microbiologia lattiero-casearia*, Edagricole, Bologna
- Bozdogan B., Berrezouga L., Kuo M.S., Yurek D.A., Farley K.A., Stockman B.J. and Roland Leclercq (1998). A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(4):925-929.
- Briggiler Marcò M., Capra M.L., Quiberoni A., Vinderola C.G., Reinheimer J.A., Hynes E. (2007). Non starter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making : in vitro characterisation and performance in two model cheeses. *J. Dairy Sci.* 90:4532-4542.
- Bruinenberg P.G., De Roo G., Limsowtin G.K.Y. (1997). Purification and characterisation of cystathionine gamma-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in flavour compound formation during cheese maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:561-566.
- Buchelli-Ramirez H.L., Alvarez-Alvarez C., Rojo-Alba S., García-Clemente M., Cimadevilla-Suárez R., Pando-Sandoval A., Casan-Clarà P. (2013). Necrotising pneumonia caused by *Lactococcus lactis cremoris*. *Int. J. Tuberc. Lung.* 17(4):565-567.
- Bude Ugarte M., Guglielmotti D., Giraffa G., Reinheimer J., Hynes E. (2006). Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses : genetic characterization and resistance to biological barriers. *J. Food Prot.* 69:2983-2991.
- Cai H., Rodriguez B.T., Zhang W., Broadbent J.R., Steele J.L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* 153:2655–2665.
- Caplan M.S., Miller-Catchpole R., Kaup S. (1999). Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*; 117:577-583.
- Cataloluk O., Gogebakan B. (2004). Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiol. Lett.* 236:7–12.
- Chamba J.F., Irlinger F. (2004). Secondary and adjunct cultures. In *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 General Aspects, Ed. P.F. Fox, P. McSweeney, T.M. Cogan, e T.P. Guinee. Elsevier Academic Press Inc. London, UK. p. 191-206.

- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins K. (1998). Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Lactobacillus* species. J. of Food Protection 61(12):1636-1643.
- Charteris W.P., Kelly P.M.2, Morelli L., Collins J.K. (2000). Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. J. of Food Protection 63(10):1369-1376.
- Chavers L.S., Moser S.A., Funkhouser E., Benjamin Jr, W.H., Chavers P., Stamm A. M., Waites K. B. (2003). Association between antecedent intravenous antimicrobial exposure and isolation of vancomycin-resistant enterococci. Microb. Drug Resist. 9(1):69-77.
- Chopra I., Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65:232-260.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J Dairy Sci 66:1219-1227.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performances standards for antimicrobial susceptibility testing, Seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
- Comunian R., Daga E., Dupré I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi G., Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L., De Lorentiis A. and Giraffa G. (2010). Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. Int. J. Food Microbiol. 138:151-156.
- Cooper J.E., Feil E.J. (2006). The phylogeny of *Staphylococcus aureus* - which genes make the best intra-species markers? Microbiology 152:1297-1305.
- Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Lait 85:193-204.
- Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antoine van Leeuwenhoek 76:217-246.

- Cross M.L., Ganner A., Teilab D., Fray, L.M. (2004). Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 42(2):173-180.
- Csonka L.N. and Hanson A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:569–606.
- Curragh H.J., Collins M.A. (1992). High levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 73:31– 36.
- Danielsen M. (2002). Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid* 48:98-103.
- Danielsen M., Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82:1–11.
- Davies J. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants, p. 15-27 In D.J. Chadwick and J. Goode (eds.), *Antibiotic resistance: origin, evolution, selection and spread*, Ciba foundation symposium 207. Wiley, Chichester.
- Davison J. (1999). Genetic Exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42(2):73-91.
- De Angelis M., de Candia S., Calasso M., Faccia M., Guinee T., Simonetti M., Gobbetti M. (2008). Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high-moisture traditional Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125:123-132.
- De Angelis M., Di Cagno R., Huet C., Crecchio C., Fox P.F., Gobbetti M. (2003). Heat Shock Response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1336-1346.
- de Giori G.S., de Valdez G.F., de Ruiz Holgado A.P. and Oliver G. (1985). Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 68:2160-2164.
- de las Rivas B., Marcobal A., Munoz R. (2004). Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7210–7219.

- de las Rivas B., Marcobal A. & Munoz R. (2006). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology* 152:85–93.
- de Moreno de Leblanc A. and Perdigón G. (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med. Sci. Monit.* 10(4) BR96–BR104.
- De Vos P., Truper H.G., Tindall B.J. (2005). Judicial commission of the international committee on systematics of prokaryotes, 10th international congress of bacteriology and applied microbiology, minutes of meetings 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:525-532.
- de Vrese M. e Schrezenmeir J. (2008). Probiotics, probiotics and synbiotics. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 111: 1-66.
- de Vrese M., Stegelmann A., Richter B. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of clinical Nutrition* 73 (2):4215-4295.
- De Vries M., Vaughan E., Kleerebezem M., de Vos W. (2006). *Lactobacillus plantarum*: survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.* 16:1018-1028.
- Delgado S., Florez A.B., Mayo B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr. Microbiol.* 50:202–207.
- DeLisle S., Perl T.M. (2003). Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* 123:504S–518S.
- Dellaglio F., Felis G. E., Castioni A., Torriani S., Germond J.E. (2005). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. nov., isolated from Indian dairy products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:401–404.
- Dellaglio F., Felis G.E., Torriani S. (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins *et al.* 1989: request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52:285-287.

- Desai A.R., Shah N.P., Powell I.B. (2006). Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. J. Dairy Sci. 89:3345-3351.
- Detmers F.J.M., Kunji E.R.S., Lanfermeijer F.C., Poolman B., Konings W.N. (1998). Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. Biochem. 37:16671-16679.
- Duan Y., Tan Z., Wang Y., Li Z., Qin G., Huo Y., Cai Y. 2008. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. J. Gen. Appl. Microbiol. 54:51.60.
- Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V., Tinail N. and Litopoulou-Tzanetaki E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. J Appl. Microbiol. 91:861–870.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Guidance on the, Assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 2012;10(6):2740.[10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.
- Egervarn M., Lindmark H., Roos S., Huys G. and Lindgren S. (2007). Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. Antimicrob Agents Chemother 51:394-396.
- Elkins C.A. and Mullis L.B. (2004). Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid Environ. Microbiol. 70(12):7200-7209.
- Ercolini D., Hill P., Dodd C. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. Appl. Environ. Microbiol. 69:3540-3548.
- Erickson K.L., Hubbard, N.E. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. J. Nutr. 130(2):403S-409S.
- European Commission (EC) (2003). On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in feed/food and feed/food production.

- FAO e WHO (2006): Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85.
- Farrow J.A.E, Collins M.D. (1984). DNA base composition, DNA/DNA homology and long chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. J. Gen. Microbiol. 130:357-362.
- Florez A.B., Delgado S., Mayo B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Can. J. Microbiol. 51:51–58.
- Fons M., Hege T., Ladire M., Raibaud P., Ducluzeau R., Maguin E. (1997). Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. Plasmid 37:199–203.
- Fukushima Y., Kawata Y., Hara H. (1998). Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol. 42:39-44.
- Gatti M., Lazzi C., Rossetti L., Mucchetti G., Neviani E. (2003). Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. J. Appl. Microbiol. 95(3):463-470.
- Gevers D., Danielsen M., Huys G. and Swings J. (2003). Molecular Characterization of *tet(M)* Genes in *Lactobacillus* Isolates from Different Types of Fermented Dry Sausage. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2):1270-1275.
- Gevers D., Huys G., Devlieghere F., Uyttendaele M., Debevere J. and Swings J. (2000). Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. Syst Appl Microbiol 23:279-284.
- Giraffa G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. Int. Journal Food Microbiol. 88:215-222.
- Giraffa G., Lazzi C., Gatti M., Rossetti L., Mora D., Neviani E. (2003). Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. Int. J. Food Microbiol. 82(2):163-172.

- Giraffa G., Pepe G., Locci F., Neviani E., Carminati D. (1995). Hemolytic activity, production of thermonuclease and biogenic amines by dairy enterococci. *Ital. J. Food Sci.* 7:341-349.
- Giraffa G., Sisto F. (2006). Susceptibility to vancomycin of enterococci isolated from dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 106:1-24.
- Glaasker E., Konings W.N., Poolman B. (1996). Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178:575–582.
- Glaasker E., Tjan F.S., Ter Steeg P.F., Konings W.N., Poolman B. (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J. Bacteriol.* 180:4718–4723.
- González L., Sacristán N., Arenas R., Fresno J.M., Tornadijo M.E. (2010). Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology* 27:592-597.
- Grattepanche F., Miescher-Schwenninger S., Meile L., Lacroix C. (2008). Recent development in cheese cultures with protective and probiotic functionales. *Dairy Sci. Technol.* 88:421-444.
- Guarner F., Perdigòn G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B., Morelli L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* 93:783-786.
- Guarner F., Kahn A. G., Garish J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A., Krabshuis J. e le Mair T. (2010). Probiotics and probiotics. *National Therapy & Metabolism* April-June 2010:1-22
- Guarner F., Schaafsma G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 237-238.
- Guglielmotti D., Briggiler M., Golowczyc M., Reinheimer J.A., Quiberoni A. (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int. Dairy J.* 17:916-925.

- Guglielmotti D.M., Reinheimer J.A., Binetti A.G., Giraffa G., Carminati D., Quiberoni A. (2006). Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains. *Int. J. Food Microbiol.* 111:126-133.
- Hadjisymeou S., Loizou P., Kothari P. (2013). *Lactococcus lactis cremoris* infection: not rare anymore? *BMJ Case Rep.* doi:pil: bcr2012008479.
- Hamilton-Miller J.M.T. and Shah S. (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:153-154.
- Haza A.I., Cabala A., Morales P. (2004). Protective effect and cytokine production of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* 14(1)29-38.
- Hegazi F.Z. and Abo-Elnaga, I.G. (1987). Proteolytic activity of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food/Nahrung* 31(3):225-232.
- Helinck S., Le B.D., Moreau D., Yvon M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3855-3861.
- Herreros M.A., Fresno J.M., González Prieto M.J., Tornadijo M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13:469-479.
- Herreros M.A., Arenas R., Sandoval M.H., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E. (2007). Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: a preliminary study. *Int. Dairy J.* 17:328-335.
- Holler B. J. and Steele J. L. (1995). Characterization of lactococci other than *Lactococcus lactis* for possible use as starter cultures. *Int. Dairy J.* 5:275-289.
- Holmes E.C., Urwin R., Maiden M.C. (1999). The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* 16(6):741-749.

- Holzapfel W. H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41(2):85-101.
- Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., ... & Willems R.J. (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 40(6):1963-1971.
- Hummel A.S., Hertel C., Holzapfel W.H. and Franz C.M.A.P. (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. environ. Microbiol.* 73(3):730-739.
- Hutkins R.W., Ellefson W.L., Kashket E.R. (1987). Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2275–2281.
- Huys G., D’Haene K., Swings J. (2006). Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1550–1551.
- Huys G., D’Haene K. and Swings J. (2002). Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method. *Lett Appl. Microbiol.* 34:402–406.
- Isolauri E. (2001). Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(6): 1142S-1146S.
- Isolauri E., Majamaa H., Arvola T. (1993). *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*; 105:1643-1650.
- Jefferies J., Clarke S.C., Diggle M.A., Smith A., Dowson C., Mitchell T. (2003). Automated pneumococcal MLST using liquid-handling robotics and a capillary DNA sequencer. *Mol. Biotechnol.* 24(3):303-307.
- Jin L.Z., Marquardt R.R., Zhao X. (2000). A strain of *Enterococcus faecium* (18c23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *E. coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4200-4204.

- Jones N., Bohnsack J.F., Takahashi S., Oliver K.A., Chan M.S., Kunst F., ... & Spratt B.G. (2003). Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. J. Clin. Microbiol. 41:2530–2536.
- Kaila M., Isolauri E., Soppi E. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. Pediatr. Res. 32:141-144.
- Katla A.K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Int. J. Food Microbiol. 67:147–152.
- Kets E.P. W, Teunissen P.J. M., De Bont J.A.M. (1996). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. Appl. Environ. Microbiol. 62:259–261.
- Khalid N.M. and Marth E.H. (1990). Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. J. Dairy Sci. 73:3068-3076.
- Kieronczyk A., Skeie S., Langsrud T., Yvon M. (2003). Cooperation between *Lactococcus lactis* and non starter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. Appl. Environ. Microbiol. 69:734-739.
- Kim W. S., Perl L., Park J. H., Tandianus J. E. Dunn, N. W. (2001). Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. Curr. Microbiol. 43(5):346-350.
- Kimoto-Nira H., Aoki R., Mizumachi K., Sasaki K., Naito H., Sawada T., Suzuki C. (2012). Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: development of a new starter culture. J Dairy Sci. 95(4):2176-85.
- Kirjavainen P. V., Ouwehand A. C., Isolauri E., Salminen S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiol. Lett., 167(2):185-189.
- Klare I., Konstabel C., Müller-Bertling S., Reissbrodt R., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H., Witte W. (2005). Evaluation of new broth media for microdilution

antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci and Bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 12:8982-8986.

- Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Muller-Bertling S., Witte W. and Goossens H (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob. Chemother. 59:900–912.
- Klein G., Hallmann C., Casas I.A., Abad J., Louwers J., Reuter G. (2000). Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. J. Appl. Microbiol. 89:815–824.
- Klein G., Pack A., Bonnaparte C. e Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.
- Knudtson L.M. and Hartman P.A. (1993). Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. J. Food Prot. 56:489-492.
- Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N. (1996a). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antoine van Leeuwenhoek. 70:187-221.
- Kunji E.R.S., Mierau I., Poolman B., Konings W.N., Venema G., Kok J. (1996b). Fate of peptides in peptidase mutants of *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 21, 123-131.
- Kunji E.R.S., Smid E.J., Plapp R., Poolman B., Konings W.M. (1993). Physiological responses of *Lactococcus lactis* M13 to alternating conditions of growth and starvation. J. Bacteriol. 175:2052-2059.
- Kushiro A., Chervaux C., Cools-Portier S., Perony A., Legrain-Raspaud S., Obis D., Onoue M. and van de Moer A. (2009). Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and Etest. Int J Food Microbiol 132:54-58.
- Lapujade P., Coccagn-Bousquet M., Loubiere P. (1998). Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. Appl. Environ. Microbiol. 64:2485-2489.

- Le Bars D. and Yvon M. (2008). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *J. Appl. Microbiol.* 104(1):171-177.
- Levy S.B., Marshall B. (2004). Antibacterial resistance world wide: causes, challenges and responses. *Nat. Med. Rev.* 10:122–129.
- Levy S.B., Salyers A.A. (2002). Reservoirs of antibiotic resistance (ROAR) Network.<http://www.healthsci.tufts.edu/apua/Roar/roarhome.htm>.
- Levri K.M., Ketvertis K., Deramo M., Merenstein J.H., D Amico F. (2005). Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J. Fam. Practice* 54(7):613.
- Liu S., Asmundson R.V., Gopal P.K., Holland R., Crow V.L. (1998). Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2111–2116.
- Lodi R. (2003). Caratterizzazione di formaggi tipici, relazione tratta dal convegno “Le giornate del chimico e del microbiologico degli alimenti”.
- Lombardi A., Dal Maistro L., De Dea P., Gatti M., Giraffa G., Neviani E. (2002). A polyphasic approach to highlight genotypic and phenotypic diversities of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from dairy starter cultures and cheeses. *J. Dairy Res.* 69(01):139-149.
- Lombardi A., Gatti M., Rizzotti L., Torriani S., Andrighetto C., Giraffa G. (2004). Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 14:967-976.
- Liu C., Zhang Z.Y., Dong K., Yuan J.P. e Guop X.K. (2009) Antibiotic resistance of probiotic strains of Lactic Acid Bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed Environ Sci* 22:401-412.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin,R., ... and Spratt B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:3140–3145.

- Marangoni F. e Poli A. (2010). Dossier scientifico su probiotici e prebiotici. Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari, Milano, Luglio 2010.
- Masco L., Van Hoorde K., De Brandt E., Swings J., Huys G. (2006). Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. J. Antimicrob. Chemother. 58:85–94.
- Mater D.D., Bretigny L., Firmesse O., Flores M. J., Mogenet A., Bresson J. L., Corthier G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. FEMS Microbiol. Lett. 250(2):185-187
- Mathur S., Singh R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. Int. J. Food Microbiol. 105:281-295.
- Mayo B., Hardisson C. and Brana A.F. (1990). Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. J Dairy Res 57:125–134.
- Milillo S.R., Story R.S., Pa D., O’Bryan C.A., Crandall P.G., Ricke S.C. (2013). Antimicrobial properties of three lactic acid bacterial cultures and their cell free supernatants against *Listeria monocytogenes*. J. Environ. Sci. Health Part B 48(1):63-68.
- Moubareck C., Bourgeois N., Courvalin P., Doucet-Populaire F. (2003). Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. Antimicrob. Agents Chemother. 47(9):2993-2996.
- Moubareck C., Gavini F., Vaugien L., Butel M.J., Doucet-Populaire F. (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. J. Antimicrob. Chemother. 55:38–44.
- Mucchetti G., Neviani E. (2006). Microbiologia e tecnologia lattierocasearia. Qualità e sicurezza. Editore: Tecniche nuove.
- Mucchetti G., Neviani E., Todesco R., Lodi R. (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani.II. Attività lipolitica e caseinolitica. Latte 7:821.

- Neviani E., Mucchetti G., Contarini G., carini S. (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani.I. Loro presenza in formaggi di monte ed impiego in un innesto selzionato. Latte 7:722.
- Nieto-Arribasa P., Povedaa J.M., Seseña S., Palop Ll., Cabezas L. (2009). Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. Food Control 20(12):1092-1098.
- Nieto-Arribas P., Seseña S., Poveda J.M., Palop Ll. and Cabezas L. (2009). Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. J. Appl. Microbiol. 107:1505-1517.
- Nomura M., Kobayashi M., Narita T., Kimoto-Nira H., Okamoto T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. J. Appl. Microbiol. 101:396-405.
- Normark B.H., Normark S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. J. Intern. Med. 252:91–106.
- Obis D., Guillot A., Gripon J.C., Renault P., Bolotin A., Mistou M. Y. (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. J. Bacteriol. 181:6238–6246.
- Olsvik B., Olsen I., Tenover F.C. (1995). Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. Oral Microbiol Immunol 10:87.
- Ouoba L.I.I., Lei V., Jensen L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. Int J Food Microbiol 12:217–224.
- Panoff J.M., Thammavongs B. and Gueguen M. (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. Cryobiology 40:264–269.

- Pacini F., Cariolato D., Andrighetto C., Lombardi A. (2006). Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. FEMS Microbiol. Lett. 261:69-73.
- Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat science 65(2):859-867.
- Passerini D., Beltramo C., Coddeville M., Quentin Y., Ritzenthaler P., Daveran-Mingot M.L., Le Bourgeois P. (2010). Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. PLoS ONE 5(12): e15306. doi:10.1371/journal.pone.0015306.
- Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C., Steele J.L. (1999). Genetic characterisation of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. J. Bacteriol. 181:4592-4597.
- Pedonese F., Innocenti E., Nuvoloni R., D'ascenzi C., Giraffa G., Neviani E., Rindi S., Cerri D. (2002). Caratterizzazione delle microflora autoctone del formaggio tradizionale ovino prodotto del Parco Regionale Migliarino-San Rossore-Massaciuccoli. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia. 53: 213-218.
- Pérez G., Cardell E., Zárate V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. Int. J. Food Sci. Tech 38:537-546.
- Perreten V., Kolloffel B. and Teuber M. (1997). Conjugal transfer of the Tn 916-like transposon TnF01 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 20:27- 38.
- Pfeltz R.F., Wilkinson B.J. (2004). The escalating challenge of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Curr. Drug Targets Infect. Disord. 4:273–294.
- Pillidge C.J., Sheehy L.M., Shihata A., Pu Z.Y., Dobos M., Powel I.B. (2009). Intragenomic 16S rRNA gene heterogeneity in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Int. Dairy J. 19:222-227.
- Poolman B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. Antoine Van Leeuwenhoek 82:147-164.

- Poolman B. and Glaasker E. (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* 29:397–407.
- Pot B., Tsakalidou E. (2009). Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In: Ljungh A., Wadstrom T. (Eds.), *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 3-58.
- Rademaker J.L., Herbet H., Starrenburg M.J., Naser S.M., Gevers D., Kelly W.J., Hugenholtz J. Swings J., van Hylckama Vlieg J.E. (2007). Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG) 5-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22):7128-7137.
- Raha A.R., Ross E., Yusoff K., Manap M.Y., Ideris A., (2002). Characterisation and molecular cloning of an erythromycin resistance plasmid of *Lactococcus lactis* isolated from chicken cecum. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 6:7–11.
- REGOLAMENTO (CE) N. 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 settembre 2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, n. L268/29 del 18/10/2013.
- Requena T., Pelaez C. and Desmazeaud M.J. (1991). Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semihard goat's cheese. *J Dairy Res* 58:137–145.
- Roberts M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 245:195–203.
- Rodriguez E., Calzada J., Arqués J.L., Rodriguez J.M., Nunez M., Medina M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. *Internat. Dairy J.* 15(1):51-57.
- Rossetti L., Fornasari M., Gatti M., Lazzi C., Neviani E., Giraffa G. (2008). Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. *Int J. Food. Microbiol.* 127(1-2):168-71.
- Roth M. (1971). Fluorescence reaction for aminoacids. *Anal Chem* 43:880-882.

- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Salvadori del Prato O. (1998). *Trattato di tecnologia casearia*, Edagricole, Bologna.
- Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2008). Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology* 25(3):429-441.
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:394-406.
- Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematic. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5):873.
- Settanni L., Moschetti G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27(6):691-697.
- Siezen R.J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* 76:139- 155.
- Simons S.S. Jr., Johnson D.F. (1976). The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines. *J Am Chem Soc* 98:7098-7099.
- Simons S.S. Jr., Johnson D.F. (1978). Reaction of o-phthaldialdehyde and thiols with primary amines: fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. *Anal Biochem* 90:705-725.
- Simpson W.J., Hammond J.R.M. and Miller R.B. (1988). Avoparcin and vancomycin useful antibiotics for the isolation of brewery lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 64:299-309.
- Somero, G.N. (1995). Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.*, 57(1):43-68.

- Spratt BG (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:312–316.
- Stanley G. (1998). Cheeses. In: *Microbiology of Fermented Foods*. Vol 1, ed. B.J.B. Wood 263-307. London: Blackie Academic and Professional.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
- Sutcliffe J., Grebe T., Tait-Kamradt A. and Wondrack L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(11):2562–2566.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731-2739.
- Tanganurat W., Quinquis B., Leelawatcharamas V., Bolotin A. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. *J. Basic. Microbiol.* 49:377–385.
- Tanigawa K. and Watanabe K. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii* (2011). *Microbiology* 157:727–738.
- Tanous C., Kieronczyk A., Helinck S., Chambellon E., Yvon M. (2002). Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1-4):271-278.
- Tannock G.W. (1987). Conjugal transfer of plasmid pAMX1 in *Lactobacillus reuteri* and between lactobacilli and *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2693–2695.
- Tavaría F.K., Dahl S., Carballo F.J., Malcata F.X. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 85:2462-2470.

- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J., (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81:1–10.
- Teuber M., Meile L. and Schwarz F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:115-137.
- Thomas T.D., Crow V.L. (1984). Selection of galactose fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:86-191.
- Thomas T.D., Mills O.E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Milk Dairy Journal*, 35:255-273.
- Tigermeier F., Hillen W. (2002). Global control of sugar metabolism: a Gram positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:59-71.
- Tinson W., Hiller A.J., Jago G.R. (1982). Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. Utilization of lactose, glucose and galactose. *Aust. J. Dairy Technol.* 38:8-13.
- Torriani S. e Marzotto M. (2007). Probiotici e prebiotici. Aracne editrice, La microbiologia applicata alle industrie alimentari, Roma. cap. 5: 338-339.
- Turchi B., Mancini S., Fratini F., Pedonese F., Nuvoloni R., Bertelloni F., Ebani V.V., Cerri, D. (2013). Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-013-1356-7.
- Uguen P., Hamelin J., Le Pennec J.P., Blanco C. (1999). Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:291–293.
- Van der Heide T. and Poolman B. (2000). Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol.* 182:203–206.

- van Hylckama Vlieg J.E., Rademaker J.L., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J. and Siezen R.J. (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:183-190.
- Van Tassell M.L. and Miller M.J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 3(5): 613-636.
- Vickerman M.M., Brossard K. A., Funk D. B., Jesionowski A. M. e Gill S. R. (2007). Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol.* 56:110-118.
- Villedieu A., Diaz-Torres M.L., Hunt N., McNab R., Spratt D.A., Wilson M., Mullany P. (2003). Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:878–882.
- Vinderola C.G., Prosello W., Ghiberto T.D., Reinheimer J.A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *J. Dairy Sci.* 83(9):1905-1911.
- Wegmann U., O'Connell-Motherway M., Zomer A., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson M., Kuipers O., Sinderen D. v. and Kok J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189:3256-3270.
- Whitaker R.D., Batt C. A. (1991). Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(5):1408-1412.
- Wouters D., Grosu-Tudor S., Zamfi, M., De Vuyst L. (2013). Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. *J. Sci. Food Agr.* DOI: 10.1002/jsfa.6184.
- Xanthopoulos V., Hatzikamari M., Adamidis T., Tsakalidou E., Tzanetakis N. and Litopoulou-Tzanetak E. (2000). Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* isolates from Feta cheese throughout ripening. *J. Appl. Microbiol.* 88:1056-1064.

- Yvon M., Rjinen L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11:185-201.
- Yoon S., Barrangou-Pouey R. O. U. D. O. L. P. H. E., Breidt F., Fleming H.P. (2007). Detection and characterization of a lytic *Pediococcus* bacteriophage from the fermenting cucumber brine. *J. Microbiol. Biotechn.* 17(2):262.
- Zago M., Fornasari M. E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J.A., Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28(5):1033-1040.
- Zhou J.S., Pillidge C.J., Gopal P.K., Gill H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98:211–217.
- Ztaliou I., Tsakalidou E., Tzanetakis N. and Kalantzopoulos G. (1996). *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Greek cheese. Taxonomic characterization and screening for enzyme activities. *Lait* 76:209-216.

Infinite grazie a tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa tesi: Prof. Cerri, Dr. Miller, Francesca, Filippo, Roberta, Bruno, Beatrice, Simona, Fabrizio, Valentina, Bissi, Simone, Jennifer, Max, Mariachiara, Bibi, Emanuela, Dr. Giraffa, Dr. Carminati, Mino e tutta la mia famiglia.